

***Estudo da resposta espectral óptica em transmissão  
dos tecidos biológicos sob a influência de diferentes  
agentes osmóticos***



Universidade do Porto  
Faculdade de Engenharia  
**FEUP**

Luís Manuel Couto Oliveira

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**Estudo da resposta espectral óptica em transmissão dos tecidos  
biológicos sob a influência de diferentes agentes osmóticos**

Luís Manuel Couto Oliveira

Licenciado em Optoelectrónica e Lasers  
pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial dos  
requisitos do grau de mestre  
em  
Engenharia Biomédica

Dissertação realizada sob a orientação de  
Professor Doutor Armindo Luís Vilar Soares Lage  
do Departamento de Engenharia Electrotécnica e de Computadores  
da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

e sob a co-orientação de  
Professor Doutor Manuel António Caldeira Pais Clemente  
do Departamento de Otorrinolaringologia  
da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Consultor da Dissertação – Professor Doutor Valery V. Tuchin do Departamento de Física da  
Universidade de Saratov – Federação Russa

Porto, Setembro de 2006

Para a minha esposa Clementina  
e o meu filho Luís Rafael

## Errata

## Resumo

Com o propósito de recolher informação para posterior desenvolvimento de metodologias e melhoramento de acções clínicas que utilizam tecnologias ópticas, pretendia-se realizar dois estudos experimentais com tecido muscular da parede abdominal do rato. O primeiro consistia em estudar e caracterizar a dependência entre o efeito temporário de transparência óptica criado no tecido e a concentração de Etileno Glicol e de Glicerina em solução aquosa utilizados como líquidos de imersão. O segundo estudo consistia em caracterizar os efeitos temporários de transparência criados por diferentes tipos de agentes químicos bio compatíveis e hiper osmóticos no mesmo tipo de tecido. Estes agentes eram a Glicerina, a Glucose, o Etileno Glicol, o Propileno Glicol e uma solução composta por Etanol, Glicerina e Água destilada.

Foi criada uma montagem experimental adequada a medir os espectros de transmitância de amostras de músculo no estado natural *in vitro* e durante a imersão nos agentes considerados. Os espectros medidos foram processados para representar curvas de evolução temporal da transmitância dos tecidos durante o tratamento com cada um dos agentes em 10 comprimentos de onda uniformemente distribuídos do ultravioleta ao infravermelho, onde se localiza a maioria dos comprimentos de onda utilizados nos processos clínicos de diagnóstico e tratamento. Mediram-se também as variações de massa e de espessura das amostras de tecido, assim como do pH, do índice de refração e da organização interna do tecido, para complementar o estudo óptico.

Verificou-se no primeiro estudo uma dependência crescente entre a concentração do agente aplicado e o efeito de transparência criado. Observou-se para todas as soluções estudadas a diminuição da massa e do pH devido ao processo de desidratação do tecido que é estimulado pela pressão osmótica do agente ao difundir-se para o interior. Estas variações aumentam com a concentração do agente aplicado. Por outro lado, a distribuição interna das fibras musculares torna-se mais dispersa com o tratamento e o seu diâmetro médio reduz devido à pressão do agente que se insere em grandes quantidades entre as fibras. Esta inserção proporciona a adaptação de índices de refração dentro do tecido o que reduz o espalhamento da radiação óptica que atravessa o tecido, aumentando assim a transmitância. Nos primeiros dez segundos de tratamento, verifica-se a ocorrência de oscilações na evolução temporal da transmitância, consequência do processo de desidratação. Durante o primeiro minuto, verifica-se um aumento rápido dos níveis de transmitância do tecido para depois ocorrer o regime linear de saturação. As soluções com menor concentração apresentam uma ligeira inversão do comportamento crescente entre a fase inicial de grande crescimento e o regime final de saturação. Para estas soluções, o regime de saturação apresenta-se ligeiramente decrescente passando a crescente para as soluções de maior concentração. Nos espectros medidos nos primeiros 25 segundos, surgem bandas de absorção no infravermelho, que poderão indicar o movimento de água durante a desidratação do tecido. Caracterizaram-se os efeitos de transparência temporária à custa do estudo óptico e das variações dos parâmetros considerados. A dependência crescente entre a concentração do agente e o efeito de transparência criado verificou-se ser superior para a Glicerina. No segundo estudo, observaram-se variações e comportamentos semelhantes, tendo-se caracterizado o efeito de transparência de forma análoga. Com os resultados obtidos surgiram novas áreas de investigação que merecem ser exploradas. Uma em particular, consiste na caracterização cuidadosa da dependência entre a concentração do agente e o efeito criado para permitir a preparação de soluções a utilizar em processos clínicos para a sua optimização.

## Abstract

To obtain information for posterior development of methodologies to improve biomedical optics procedures, two studies were made with abdominal wall muscle samples from rat. The first study was performed to characterize the dependency between the temporary transparency effects created and the concentration of the immersion biocompatible and hiperosmotic chemical agents applied. Such agents were Ethylene Glycol and Glycerol in aqueous solution. The second study was performed to characterize the transparency effects created by solutions of Glycerol, Glucose, Ethylene Glycol, Propylene Glycol and a mixture of Ethanol, Glycerol and Distilled Water.

An adequate experimental setup was developed to measure the spectral transmittance of muscle samples in *in vitro* natural state and while immersed in the different chemical agents. The measured spectra were processed to represent the time evolution curves of tissue transmittance, while immersed, for 10 wavelengths regularly distributed between ultraviolet and infrared, where the majority of clinical wavelengths are located. As a complement to the optical study, certain tissue sample variations were measured. Variations of mass, sample thickness, pH, refractive index and internal organization were considered.

In the first experimental study, it was verified that the clearing effect created in tissue samples grows with concentration of applied agent. It was also observed for all the considered solutions, that mass and pH lower their natural values due to the dehydration process, which is stimulated inside the tissue by the osmotic pressure created by the agent when diffusing into the sample. Such variations grow with the agent's concentration. On the other hand, the internal distribution of muscle fibbers tends to become more disperse after the application of osmotic treatment, and their mean diameter is reduced due to high agent's pressure, created when large quantities of agent insert into inter-fibber spaces. Transmittance increase is related to agent's inclusion between muscle fibbers and consequent refractive index matching which reduces light scattering inside tissue sample. In the first 10 seconds of treatment, it is verified the occurrence of temporal oscillations in transmittance. Such phenomenon is caused by the dehydration process. In the first minute, tissue transmittance rises very fast to a higher level. It then passes to a saturation regime, which is almost horizontal. Less concentrated solutions show a slight inversion of the initial rising tendency, before the saturation regime. This regime is slightly decreasing in time for the low concentrated solutions and it tends to an increasing behaviour as agent's concentration rises. By observing measured spectra in the first 25 seconds for each case, it is possible to identify some spectral modifications due to the occurrence of some absorption bands in the infrared. These bands might indicate water movement inside the sensing area and though translate the dehydration process. It was possible to characterize the temporary optical clearing effects with the optical measurements and tissue parameter variations for the cases of Ethylene Glycol and Glycerol. The growing dependency between the agent's concentration and the optical clearing effect is stronger for the case of Glycerol. In the second study, similar variations and behaviours occur. The optical clearing effects were characterized for all considered agents from the time evolution curves and parameter variations. With the obtained results some key research lines have emerged, which deserve some particular interest. In particular, a careful study of the dependency between agent's concentration and the optical clearing effect will allow the preparation of ideal osmotic solutions for particular clinical process optimization.

## **Prefácio**

### **Prefácio**

A aplicação das tecnologias ópticas em medicina encontra-se limitada pelas propriedades ópticas dos diversos materiais biológicos que compõem o corpo humano. Os elevados coeficientes de absorção e espalhamento que esses materiais apresentam, assim como as variações abruptas no índice de refração que ocorrem devido à constituição heterogénea dos materiais biológicos originam grande atenuação, maioritariamente devido a um forte espalhamento, a qualquer feixe de radiação óptica que se propague no interior do material.

A capacidade de controlo das propriedades ópticas dos materiais biológicos consiste num campo recente de investigação da óptica médica muito promissor. Dos quatro métodos actualmente conhecidos, a criação de efeitos de transparência temporários por imersão em agentes químicos bio compatíveis e hiper osmóticos, tem apresentado os melhores resultados. O efeito é considerado temporário, visto poder ser posteriormente revertido por hidratação do material biológico. Este método aumenta a transparência dos tecidos biológicos por desidratação e adaptação de índices de refração no interior dos tecidos. A água que se distribui naturalmente nos espaços intersticiais dos tecidos apresenta um índice de refração relativamente baixo quando comparado com os verificados para os diversos constituintes sólidos. Esta transição localizada de índices de refração está na origem do espalhamento a que os fotões são sujeitos. A substituição dessa água por soluções aquosas com índices de refração mais elevados reduz o espalhamento da radiação óptica.

Actualmente, conhecem-se vários agentes adequados para a criação de efeitos temporários de transparência. Todos estes agentes podem ser considerados como soluções químicas inseridas nos grupos dos açúcares, álcoois ou soluções electrolíticas. Vários estudos foram já realizados para caracterizar os efeitos criados por estes agentes em diversos tipos de tecido. O caso da pele, suscita grande interesse, dada a constituição complexa que apresenta nas suas várias camadas. Dada a diversidade de agentes e de tecidos que constituem o corpo humano, restam muitos casos por estudar. Um caso particular é o de tecidos fibrosos. Estes tecidos que existem em diferentes áreas anatómicas, são um caso interessante de investigação e de potencial aplicação das tecnologias ópticas para a execução de processos de diagnóstico e curativos. A

Esclerótica é um tecido do tipo fibroso que tem sido muito estudado sob a activação osmótica, dada a grande utilização de técnicas de cirurgia laser onde a clarificação do tecido poderá trazer vantagens. Outro tipo de tecido fibroso é o musculo esquelético. Para o músculo, não temos conhecimento de trabalhos de investigação realizados para estudar os efeitos criados por agentes osmóticos. Desta forma, decidimos realizar um estudo experimental para caracterizar e comparar os efeitos temporários de transparência criados em músculo da parede abdominal do rato.

A escolha deste tipo de tecido prende-se com a sua abundância num só animal, o que permite a recolha de várias amostras e um só sacrifício para a realização de um estudo in vitro. A disponibilidade da instrumentação necessária para a medição de espectros de transmitância nas amostras de tecido, quer no seu estado natural, quer aquando imersas nos vários agentes químicos, possibilitou o estudo do efeito de transparência criado. Selecionamos 5 agentes osmóticos dos actualmente conhecidos em concentrações pré-determinadas para possibilitar dois tipos de estudo: estudo da dependência entre a concentração do agente em solução e o efeito de transparência criado e estudo de caracterização e comparação entre os efeitos criados por vários agentes. Como complemento a estes estudos, foi possível estudar o índice de refacção tanto dos agentes como dos tecidos, assim como realizar uma análise histológica dos tecidos no seu estado natural e após tratamento para caracterização e avaliação de parâmetros que variam com imersão osmótica aplicada. As variações de massa, pH, espessura do tecido, índice de refacção, densidade de fibras musculares por área da secção recta do tecido e o seu diâmetro médio foram avaliadas para complementar o estudo óptico. Todos os recursos instrumentais necessários a estes estudos foram reunidos. Em face do estudo a realizar e da instrumentação disponível, foi necessário construir um suporte mecânico para sustentar as amostras de tecidos e a instrumentação óptica de iluminação e detecção. Este suporte garante o alinhamento óptico necessário à medição de espectros em transmissão dos tecidos, o que nem sempre é fácil de conseguir. Os espectros medidos em cada estudo óptico, necessitaram de processamento para a representação de gráficos que traduzem o efeito de transparência criado para vários comprimentos de onda uniformemente distribuídos na banda espectral de medição do espectrofotómetro utilizado. Para este processamento, elaboramos alguns programas em ambiente MATLAB<sup>TM</sup> que se encontram no anexo C do presente trabalho.



## **Agradecimentos**

Muitas foram as pessoas, que de uma forma ou outra contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Gostaria de começar por agradecer ao Professor Armindo Lage, pela forma como orientou este trabalho. As suas sugestões e comentários sempre foram muito oportunos. De pequenas conversas que tivemos e sugestões que me deu, pude melhorar a execução experimental do trabalho e a escrita que aqui apresento. Apenas com a sua ajuda foi possível criar uma mentalidade de investigação cujo resultado é o presente trabalho.

Não posso esquecer o apoio logístico e instrumental que o Professor Pais Clemente me deu no interior do Hospital de São João e da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto para a execução prática da investigação. Não só no interior do Serviço de Otorrinolaringologia como abrindo portas para outros serviços e Instituições no interior do hospital, o Professor Pais Clemente sempre me deu o maior apoio. Quero também agradecer a sua prestação como co-orientador especialmente no que respeita a aspectos clínicos para os quais me chamou a atenção e que viriam a ser importantes na execução da investigação do presente trabalho. A motivação que me deu ajudou-me imenso a superar diversas dificuldades desde o início da execução do presente trabalho.

Por outro lado, gostaria de agradecer ao Professor Valery Tuchin, que apesar de se encontrar distante fisicamente do local onde decorreram os trabalhos experimentais, sempre me fez chegar a sua opinião e sugestões em alturas bastante oportunas. Como Consultor deste trabalho teve uma presença muito activa na correcção de erros de metodologia experimental dando sugestões para a sua optimização e também para a interpretação dos resultados obtidos. Não posso admitir que conseguiria apresentar o presente trabalho sem a colaboração e a orientação destes três Professores, cuja experiência em áreas tão diversas como a Engenharia, a Física e a Medicina é grande e reconhecida.

Gostaria também de agradecer ao Dr. Vítor Cardoso do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de São João, cuja assistência na fase inicial de sacrifício, dissecação e escolha de tecidos muito me ajudou e acelerou o processo de execução deste trabalho.

Quero agradecer à Professora Deolinda Lima, pela colaboração prestada pelo Instituto de Histologia e Embriologia Professor Abel Salazar, quer a nível de instrumentação, quer a nível de recursos materiais e humanos. Deste Instituto, gostaria de agradecer também à Dona Maria Amélia, pela assistência na dissecação dos animais e pós

processamento dos tecidos para a análise histológica. Agradeço também ao Doutor António Avelino pela colaboração e ensino do manuseamento do criostato para o corte dos tecidos na espessura desejada para estudo.

Agradeço aos Professores Mário de Carvalho e Paulo Silva do Departamento de Engenharia Química do ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto, pela sua disponibilidade em ceder os meios instrumentais para avaliar o índice de refração dos agentes químicos e tecidos biológicos.

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus Pais, Esposa e Filho pelo apoio, motivação e paciência que me prestaram antes e durante a execução deste trabalho.

A todos eles, manifesto o meu apreço.

## Índice

Resumo	4
Abstract	5
Prefácio	6
Agradecimentos	8
Lista de símbolos e abreviaturas	17
1. Introdução	19
2 Estado da Arte	23
2.1 Medicina e Investigação	23
2.2 O nascimento da Óptica Médica	25
2.3 Tecnologias Ópticas em Medicina na actualidade	25
2.3.1 Cirurgia Laser	26
2.3.2 Fotodiagnóstico e Fototerapia	27
2.3.3 TOC – Tomografia Óptica Coerente	28
2.4 Propagação da radiação óptica em tecidos biológicos	31
2.5 Controlo das propriedades ópticas em materiais biológicos	35
2.6 Criação de efeitos temporários de transparência por recurso a agentes osmóticos	39
2.7 Difusão de um agente para o interior da matéria biológica	47
2.8 Agentes apropriados para criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos	53
3 Metodologia	59
3.1 Construção do suporte experimental	60
3.2 Software de aquisição espectral	62
3.3 População de animais para estudo	63
3.4 Tipo de tecidos	64
3.5 Sacrifício e recolha de tecidos	65
3.6 Registo de parâmetros iniciais dos tecidos	69
3.7 Caracterização dos agentes osmóticos a utilizar	72
3.8 Tecidos de controlo da actividade osmótica de soluções	73
3.9 Estudo espectral óptico em transmissão	74
3.10 Registo de parâmetros finais	78
3.11 Pós – processamento dos tecidos	80
3.12 Tratamento de resultados obtidos no estudo óptico	81
3.13 Estudo Histológico dos efeitos criados	82
3.14 Correlação do efeito óptico com as variações histológicas, mecânicas e biológicas ocorridas nos tecidos	83
3.15 Comparação de efeitos entre tecidos tratados com o mesmo agente em diferentes concentrações	84
3.16 Comparação de efeitos entre tecidos tratados com diferentes agentes	85
3.17 Conclusões e perspectivas futuras	85
3.17.1 Interpretação de resultados e conclusões	86
3.17.2 Perspectivas futuras de investigação e aplicação dos agentes estudados	86
4 Estudo experimental	89
4.1 Avaliação dos parâmetros do tecido no seu estado natural	89
4.2 Estudo comparativo entre efeitos de dois agentes em diferentes concentrações	93
4.2.1 Quantificação de parâmetros histológicos do tecido natural	94
4.2.2 Etileno Glicol	95
4.2.2.1 Solução com concentração de 50%	96
4.2.2.2 Solução com concentração de 75%	103
4.2.2.3 Solução com concentração de 87%	109
4.2.3 Glicerina	115
4.2.3.1 Solução com concentração de 50%	115
4.2.3.2 Solução com concentração de 75%	120
4.2.3.3 Solução com concentração de 87%	125
4.3 Estudo comparativo entre efeitos criados por diferentes agentes osmóticos	131
4.3.1 Caracterização do tecido natural médio	132
4.3.2 Glicerina 50%	133
4.3.3 Glucose 40%	142
4.3.4 Etileno Glicol 99%	151
4.3.5 Propileno Glicol	160

4.3.6 Solução de Etanol + Glicerina + Água destilada nas proporções 1:1:2	168
5 Conclusões e perspectivas futuras	179
5.1 Interpretação dos resultados obtidos e conclusões	179
5.1.1 Estudo de agentes com diferentes concentrações	179
5.1.2 Estudo comparativo entre efeitos criados por diferentes agentes osmóticos	182
5.2 Perspectivas futuras de investigação e aplicação dos agentes osmóticos	184
Referências	189
Anexos	196
Anexo A – Software OOIBase da Ocean Optics	197
A.1 Janela Principal	198
A.2 Menus	199
A.2.1 Menu File	199
A.2.2 Menu View	200
A.2.3 Menu Setup	202
A.2.4 Menu Window	203
A.2.5 Menu Help	204
A.3 Botões de acesso rápido	204
Anexo B – O Refractómetro de Abbe	208
B.1 O Refractómetro de Abbe	209
B.2 Descrição dos componentes do refractómetro	212
B.3 Princípio de funcionamento	213
B.4 Factores que influenciam a medição	215
B.5 Instruções de utilização	216
B.5.1 Características técnicas	216
B.5.2 Calibração	217
B.5.3 Medições em líquidos	217
B.5.4 Medições em sólidos	218
Anexo C – Programas utilizados no processamento espectral	219
C.1 Programa para representação da evolução temporal da transmitância para os tecidos estudados em tratamento com soluções em diferentes concentrações de Glicerina e Etileno Glicol	220
C.2 Programa para representação da evolução temporal média da transmitância para os tecidos estudados em tratamento com diferentes soluções osmóticas	226

## Índice de Figuras

Fig.1: Suporte dos tecidos e da fibra de detecção	61
Fig.2: suporte superior para fibra de iluminação	62
Figura 3: Rato utilizado na investigação – Espécie <i>Wistar Han</i>	64
Figura 4: Musculo da parede abdominal exposto	66
Figura 5: Montagem experimental de medição	75
Figura 6: Transmitância natural do músculo da parede abdominal do rato	76
Figura 7: Fotografias do tecido natural: a) com ampliação 2x, b) com ampliação de 10x	94
Figura 8: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 50%	97
Figura 9: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 50% nos primeiros 110 segundos de tratamento	98
Figura 10: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 50% nos primeiros 110 segundos	99
Figura 11: Fotografia do tecido tratado com solução de Etileno Glicol a 50% com ampliação 2x	101
Figura 12: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol a 50% com ampliação 10x	102
Figura 13: Evolução temporal do espectro de transmitância do tecido devido ao tratamento com Etileno Glicol 75%	104
Figura 14: Curvas de evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 75%	105
Figura 15: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 75% nos primeiros 110 segundos de tratamento	106
Figura 16: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 75% nos primeiros 110 segundos	106
Figura 17: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 75% com ampliação de 2x	107
Figura 18: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 75% com ampliação de 10x	108
Figura 19: Evolução temporal do espectro de transmitância do tecido devido ao tratamento com Etileno Glicol 87%	110
Figura 20: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 87%	110
Figura 21: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 87% nos primeiros 110 segundos de tratamento	111
Figura 22: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 87% nos primeiros 110 segundos	112
Figura 23: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 87% com ampliação de 2x	113
Figura 24: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 87% com ampliação de 10x	114
Figura 25: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50%	116
Figura 26: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50% nos primeiros 10 segundos de tratamento	116
Figura 27: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 50% nos primeiros 110 segundos	117
Figura 28: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 50% com ampliação de 2x	118
Figura 29: Fotografia do tecido tratado com Glicerina a 50% com ampliação de 10x	119
Figura 30: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 75%	121
Figura 31: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 75% nos primeiros 100 segundos de tratamento	122
Figura 32: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 75% nos primeiros 110 segundos	122
Figura 33: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 75% com ampliação de 2x	123
Figura 34: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 75% com ampliação 10x	124
Figura 35: Evolução temporal do espectro de transmitância do tecido devido ao tratamento com Glicerina 87%	126
Figura 36: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 87%	126
Figura 37: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 87% nos primeiros 110 segundos de tratamento	127
Figura 38: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 87% nos primeiros 110 segundos	128
Figura 39: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 87% com ampliação de 2x	129
Figura 40: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 87% com ampliação de 10x	130
Figura 41: Fotografias do tecido natural com ampliação de 2x: a) do grupo O e b) do grupo H	132
Figura 42: Fotografias do tecido natural com ampliação de 10x: a) do grupo O e b) do grupo H	133

Figura 43: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 50%	134
Figura 44: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50%	135
Figura 45: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50% nos primeiros 2 minutos de tratamento	135
Figura 46: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glicerina 50%	136
Figura 47: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glicerina 50% nos primeiros 2 minutos de tratamento	137
Figura 48: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Glicerina 50%	137
Figura 49: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Glicerina 50%	139
Figura 50: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Glicerina 50% médio nos primeiros 2 minutos	139
Figura 51: Fotografias de um tecido tratado com Glicerina 50%: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x	141
Figura 52: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso em Glucose 40%	143
Figura 53: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glucose 40%	143
Figura 54: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glucose 40% nos primeiros 2 minutos de tratamento	144
Figura 55: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glucose 40%	145
Figura 56: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glucose 40% nos primeiros 2 minutos de tratamento	145
Figura 57: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Glucose 40%	147
Figura 58: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Glucose 40%	148
Figura 59: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Glucose 40% médio nos primeiros 2 minutos	148
Figura 60: Fotografias de um tecido tratado com Glucose 40%: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x	150
Figura 61: Evolução temporal típica do espectro de transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99%	152
Figura 62: Evolução temporal típica da transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99%	153
Figura 63: Evolução temporal típica da transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99% nos primeiros 2 minutos de tratamento	153
Figura 64: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Etileno Glicol 99%	154
Figura 65: Detalhe da figura 64 para identificação das curvas com os comprimentos de onda adotados	154
Figura 66: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Etileno Glicol 99% nos primeiros 2 minutos de tratamento	155
Figura 67: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Etileno Glicol 99%	156
Figura 68: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Etileno Glicol 99%	156
Figura 69: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Etileno Glicol 99% nos primeiros 2 minutos	157
Figura 70: Fotografias de um tecido tratado com Etileno Glicol 99%: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x	159
Figura 71: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso em Propileno Glicol	161
Figura 72: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Propileno Glicol	161
Figura 73: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Propileno Glicol nos primeiros 2 minutos de tratamento	162
Figura 74: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Propileno Glicol	162
Figura 75: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Propileno Glicol nos primeiros 2 minutos de tratamento	163

Figura 76: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Propileno Glicol	164
Figura 77: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Propileno Glicol	164
Figura 78: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Propileno Glicol médio nos primeiros 2 minutos	165
Figura 79: Fotografias de um tecido tratado com Propileno Glicol: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x	167
Figura 80: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso na Mistura	169
Figura 81: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso na Mistura	169
Figura 82: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso na Mistura nos primeiros 2 minutos de tratamento	170
Figura 83: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos na Mistura	170
Figura 84: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos na Mistura nos primeiros 2 minutos de tratamento	171
Figura 85: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com a Mistura	172
Figura 86: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com a Mistura	173
Figura 87: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos na Mistura médio nos primeiros 2 minutos	174
Figura 88: Fotografias de um tecido tratado com a Mistura: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x	175
Figura A.1: Janela principal do software OOIBase da Ocean Optics.	198
Figura A.2: Menu File.	199
Figura A.3: Menu View	200
Figura A.4: Menu Setup.	202
Figura A.5: Menu Window.	203
Figura A.6: Janela de ajuda do software OOIBase.	204
Figura A.7: Janela de informação do software OOIBase.	204
Figura A.8: Botões de acesso rápido do software OOIBase.	205
Figura A.9: Espectro da fonte de Xénon apresentado pelo software	206
Figura B.1: Desvio de um feixe de radiação óptica na superfície entre o ar e um meio	210
Figura B.2: Ângulo Crítico e reflexão interna total	211
Figura B.3: Componentes do refractómetro de Abbe: (a) vista frontal; (b) vista traseira	212
Figura B.4: Princípio de funcionamento do refractómetro de Abbe	214
Figura B.5: Imagens projectadas de acordo com a concentração da amostra	214
Figura B.6: Alinhamento do retículo com linha separadora das zonas claro/escuro	214
Figura B.7: Escala com valores de índice de refração para leitura	215

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores médios medidos experimentalmente para o índice de refração de materiais biológicos humanos.	42
Tabela 2: Coeficientes de Difusão de agentes químicos em tecidos	49
Tabela 3: Agentes osmóticos bio compatíveis utilizados no controlo das propriedades ópticas de tecidos biológicos	53
Tabela 4: Atribuição dos agentes aos tecidos para o estudo das concentrações	68
Tabela 5: Grupos e designações das amostras a utilizar no estudo	68
Tabela 6: Atribuição dos agentes aos tecidos	69
Tabela 7: Tecidos e respectivo tratamento para a medição do índice de refração	79
Tabela 8: Valores de massa e índice de refração do tecido medidos em diferentes estados de desidratação	90
Tabela 9: Valores calculados pela resolução dos 45 sistemas de equações para a fracção de água em tecido natural e índice de refração dos constituintes sólidos	92
Tabela 10: Parâmetros que caracterizam o tecido natural	93
Tabela 11: Medições pontuais da espessura feitas sobre o tecido natural	94
Tabela 12: Parâmetros medidos na solução de Etileno Glicol 50%	96
Tabela 13: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Etileno Glicol 50%	96
Tabela 14: Parâmetros finais do tecido tratado com Etileno Glicol 50%	100
Tabela 15: Medições pontuais da espessura do tecido tratado com Etileno Glicol a 50%	102
Tabela 16: Parâmetros medidos na solução de Etileno Glicol 75%	104
Tabela 17: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Etileno Glicol 75%	104
Tabela 18: Parâmetros finais do tecido tratado com Etileno Glicol 75%	107
Tabela 19: Medições pontuais da espessura do tecido tratado	108
Tabela 20: Parâmetros medidos na solução de Etileno Glicol 87%	109
Tabela 21: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Etileno Glicol 87%	109
Tabela 22: Parâmetros finais do tecido tratado com Etileno Glicol 87%	112
Tabela 23: Medições pontuais da espessura do tecido tratado	113
Tabela 24: Parâmetros medidos na solução de Glicerina 50%	115
Tabela 25: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Glicerina 50%	115
Tabela 26: Parâmetros finais do tecido tratado com Glicerina 50%	117
Tabela 27: Medições pontuais da espessura do tecido tratado	118
Tabela 28: Parâmetros medidos na solução de Glicerina 75%	120
Tabela 29: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Glicerina 75%	120
Tabela 30: parâmetros finais do tecido tratado com Glicerina 75%	123
Tabela 31: Medições pontuais da espessura do tecido tratado	123
Tabela 32: Parâmetros medidos na solução de Glicerina 87%	125
Tabela 33: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Glicerina 87%	125
Tabela 34: parâmetros finais do tecido tratado com Glicerina 87%	128
Tabela 35: Medições pontuais da espessura do tecido tratado	129
Tabela 36: Espessura média dos tecidos naturais inseridos nos grupos O e H	132
Tabela 37: Número médio de fibras musculares por área de fotografia em cada grupo	133
Tabela 38: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Glicerina 50%	134
Tabela 39: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Glicerina 50%	140
Tabela 40: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Glicerina a 50%	141
Tabela 41: Parâmetros medidos na solução de Glucose 40%	142
Tabela 42: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Glucose 40%	142
Tabela 43: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Glucose 40%	149
Tabela 44: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Glucose a 40%	150
Tabela 45: Parâmetros do Etileno Glicol a 99%	151
Tabela 46: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Etileno Glicol 99%	152
Tabela 47: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Etileno Glicol 99%	158
Tabela 48: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Etileno Glicol a 99%	159
Tabela 49: Parâmetros do Propileno Glicol	160
Tabela 50: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Propileno Glicol	160



Tabela 51: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Propileno Glicol	166
Tabela 52: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Propileno Glicol	167
Tabela 53: Parâmetros da solução de Etanol+Glicerina+ Água destilada	168
Tabela 54: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com a Mistura	168
Tabela 55: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com a Mistura	174
Tabela 56: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com a Mistura	176
Tabela A.1: Opções do Menu File do software OOIBase da Ocean Optics	199
Tabela A.2: Opções do Menu View do software OOIBase da Ocean Optics	200
Tabela A.3: Opções do Menu Setup do software OOIBase da Ocean Optics	202
Tabela A.4: Opções do Menu Window do software OOIBase da Ocean Optics	203
Tabela B.1: Componentes típicos de um refractómetro de Abbe (Ver figura B.3)	213
Tabela B.2: Características típicas de um refractómetro de Abbe	217

## Lista de abreviaturas e símbolos

### Abreviaturas:

TOC – Tomografia Óptica Coerente  
ORL – Otorrinolaringologia  
KeV – Kilo – electrão – Volt  
PET – Positron Emission Tomography  
SPECT – Single Photon Emission Tomography  
TAC – Tomografia Axial Computorizada  
PEG – Polietileno Glicol  
PPG – Propileno Glicol

### Símbolos:

$n$  – Índice de refração de um material  
 $c$  – Velocidade de propagação da radiação óptica no vácuo  
 $\nu$  – Frequência da radiação óptica  
 $\mu_a$  – Coeficiente de absorção da radiação óptica  
 $\mu_s$  – Coeficiente de espalhamento da radiação óptica  
 $\lambda$  – Comprimento de onda da radiação óptica  
 $D$  – Coeficiente de difusão de um agente osmótico no material biológico  
 $f$  – Fração volumétrica (índice do símbolo indica que constituinte tecidual se refere)  
 $H$  – Hidratação do tecido  
 $d$  – Espessura da amostra de tecido

**Capítulo 1: Introdução**

## 1 Introdução

A óptica médica consiste numa ciência recente que se dedica à investigação e ao desenvolvimento de aplicações clínicas onde as tecnologias ópticas são utilizadas. Sabe-se que nas aplicações clínicas que utilizam estas tecnologias ocorrem limitações impostas pelos materiais biológicos em termos de atenuação da radiação e também nas profundidades de acção destes dentro dos tecidos. Estas limitações são impostas pelas propriedades dos materiais que causam tanto absorção da radiação como o seu espalhamento. Recentemente, a óptica médica passou a procurar soluções para resolver este problema. Em diversos trabalhos de investigação recentes foram avaliados e caracterizados os efeitos de transparência temporária criados em tecidos biológicos por administração de agentes químicos bio compatíveis e hiper osmóticos. Tais estudos antecederam a criação de novas aplicações e o melhoramento de outras actualmente existentes para a realização de diagnósticos e processos terapêuticos com recurso às tecnologias ópticas. Por serem capazes de se difundir no interior de certos tecidos, estes agentes “abrem” caminho à passagem da radiação óptica por desidratação e adaptação de índices de refração no interior dos materiais biológicos. Alguns agentes utilizados são por exemplo a Glicerina ou a Glucose diluídos em solução aquosa com concentrações pré-determinadas. Os contrastantes utilizados em técnicas radiográficas e certos tipos de gel dermatológico como o gel de Aloé Vera ou ainda o gel utilizado em ultrasonografia têm sido também experimentados e apresentam resultados promissores. Os agentes capazes de criar os efeitos temporários de transparência podem ser classificados em três grupos químicos: Açúcares, Álcoois e Soluções Electrolíticas. Todos eles se têm revelado inofensivos para os tecidos onde se tem realizado estudos, não se verificando quaisquer efeitos posteriores ou secundários. Como processo paralelo à criação da transparência temporária, os tecidos desidratam por acção do agente. A reversibilidade do processo é uma realidade. Após a criação do efeito em tecidos biológicos, estes tornam a hidratar naturalmente nos casos *in vivo* ou de forma assistida nos casos *in vitro*. Vários agentes deste tipo foram e continuam a ser testados e seus efeitos estudados em tecidos biológicos como a Derme, a Esclerótica, o Fígado ou Tecido Gástrico. O Sangue tem também sido submetido a estudos onde certos agentes osmóticos potenciam a criação de efeitos temporários de transparência. Algumas aplicações clínicas como a TOC – Tomografia Óptica Coerente, apresentaram já

resultados melhorados em termos de profundidade de acção da radiação óptica dentro do tecido e contraste, quando sob a acção de certos agentes osmóticos.

Dado tratar-se de uma linha de investigação recente, inovadora e potencial, o presente trabalho dedica-se ao estudo descritivo e comparativo dos efeitos de transparência criados em materiais biológicos por administração de certos agentes osmóticos. Os trabalhos publicados, que se referem a esta área de investigação, encontram-se um pouco dispersos, localizados em publicações de variadas especialidades de Óptica, Engenharia ou Medicina. No entanto, foi publicada recentemente uma obra <sup>(1)</sup> bastante completa acerca deste tema, onde se encontram reunidos diversos trabalhos que aplicam técnicas distintas. Nesta publicação, da autoria do consultor do presente trabalho, é feita uma extensa descrição do actual estado da arte desta particular disciplina de investigação clínica.

Para tecidos biológicos a estudar no trabalho experimental seleccionamos o tecido muscular da parede abdominal do rato. Este tecido existe em grande abundância num só animal, o que reduz o número de sacrifícios e também a população necessária para o estudo. A possibilidade de recolha dos tecidos do animal para a realização de estudos experimentais *in vitro*, permite avaliar a resposta espectral em transmissão do músculo tanto no seu estado natural, como ao longo do tempo durante o tratamento por imersão com os agentes osmóticos escolhidos para o estudo. Como o efeito de transparência apresenta uma evolução temporal, o espectro de transmissão do tecido será medido em diferentes instantes de tempo durante o tratamento químico para posterior caracterização do efeito temporal criado por cada agente osmótico a estudar. Os agentes escolhidos para o estudo experimental foram a Glicerina, a Glucose, o Etileno Glicol, o Propileno Glicol e uma outra solução que consiste numa mistura de Etanol com Glicerina e Água destilada. Estes agentes foram adquiridos em concentrações pré-determinadas, conforme os objectivos experimentais.

Esta variedade de agentes possibilitou a realização de dois tipos de estudos experimentais. O primeiro consiste na caracterização dos efeitos temporários de transparência criados nos tecidos por agentes de diferentes tipos. Escolhemos realizar este estudo com todos os agentes anteriormente mencionados. Cinco estudos deste tipo foram feitos para permitir o cálculo de efeitos de transparência médios para cada agente e respectivos desvios experimentais relativamente ao efeito médio calculado. Neste estudo foram feitas comparações entre efeitos criados pelos diferentes agentes.

O segundo estudo experimental consiste em analisar os efeitos de transparência criados por dois agentes osmóticos distintos em três concentrações diferentes para estudarmos e caracterizarmos a relação entre a concentração do agente e a grandeza do efeito criado. Neste estudo foi feita uma avaliação experimental isolada do efeito de transparência criado, de onde iremos estudar como actuam a Glicerina e o Etileno Glicol nos tecidos. As concentrações a utilizar serão de 50%, 75% e 87% em solução aquosa. Estas concentrações são facilmente preparadas por diluição, visto que podemos adquirir estes agentes na fase líquida com concentrações na ordem de 95% a 100%. Foi também feita uma comparação entre os efeitos criados pelos dois agentes na mesma concentração para avaliar as diferenças criadas pelos dois nos tecidos. Todos os tecidos naturais e tratados quimicamente que foram utilizados nos estudos experimentais foram posteriormente processados, para obtenção de informação histológica, recorrendo-se a fotografia de microscópio. O que pretendemos concretamente, consiste em observar com a ampliação adequada as alterações que ocorreram no interior dos tecidos tratados osmoticamente para podermos completar a caracterização dos efeitos de transparência temporária criados por imersão dos tecidos nos agentes.

O equipamento utilizado nos estudos experimentais é composto por um espectrofotómetro e um iluminador de fibra óptica com lâmpada de xénon. Para além destes instrumentos e respectivos acessórios como cabos de fibra óptica e software de controlo e aquisição espectral, foi necessário construir um suporte mecânico em plástico para sustentar os tecidos a estudar e a montagem experimental.

Com a caracterização e comparação dos efeitos de transparência criados pelos diferentes agentes, pretendemos adquirir informação de como estes agentes actuam no músculo tanto de forma macroscópica como de forma microscópica. Pretendemos saber qual o tempo necessário para criar o efeito para cada agente, qual a sua duração temporal, a sua grandeza e efeitos microscópicos que são originados no interior dos tecidos. Não nos preocupamos com a reversibilidade do processo, uma vez que esta foi já descrita na literatura. Com toda a informação reunida, e como o músculo é um tecido do tipo fibroso, esperamos poder estabelecer analogias para estimar efeitos criados pelos mesmos agentes em outros tipos de tecidos fibrosos muito abundantes no Ser Humano e animais. Em face dos resultados obtidos, iremos descrever e discutir acerca de possíveis benefícios que certas aplicações clínicas onde as tecnologias ópticas são utilizadas possam usufruir com a aplicação destes agentes.

## **Capítulo 2: Estado da Arte**

## **2 Estado da Arte**

A aplicação de tecnologias ópticas para investigação e desenvolvimento de instrumentação e metodologias clínicas é relativamente recente, embora os poderes terapêuticos da radiação óptica sejam conhecidos desde há séculos. Neste trabalho pretendemos utilizar estas tecnologias de forma a estudar como os tecidos biológicos respondem opticamente quando tratados por certos agentes químicos bio-compatíveis e hiper - osmóticos. Um produto osmótico é aquele que é capaz de se difundir de uma zona onde existe em grande concentração para outra onde a sua concentração é inferior (2, p.:550-551). As vantagens desta activação química, assim como as perspectivas futuras da sua utilização serão também consideradas em certas aplicações clínicas que utilizam as tecnologias ópticas.

Inicialmente vamos referir o papel importante da física e da engenharia na criação de recursos instrumentais e metodologias de diagnóstico e terapia e também descrever como surgiu o interesse na investigação de tecnologias ópticas em medicina. Os mecanismos de interacção da radiação óptica com os diversos materiais biológicos serão apresentados, assim como algumas tecnologias ópticas em medicina actuais, onde a aplicação de tratamento osmótico poderá proporcionar benefícios para o clínico e para o doente.

### **2.1 Medicina e investigação**

A Medicina é uma ciência fortemente diversificada. O corpo humano é composto por vários sistemas e cada sistema é composto por órgãos de maior ou menor complexidade (3, p.:277-278). Cada sistema é em geral composto por vários órgãos. Em face de tal diversidade, grande conjugação de sistemas individuais e complemento de funções, a medicina necessita de se ramificar em várias especialidades clínicas, como a Cardiologia, a Dermatologia, a Oftalmologia, e outras. Assim, cada especialidade médica pode dedicar-se ao estudo, diagnóstico e/ou tratamento de uma área anatómica em especial, ou sistema constituinte do corpo humano. No entanto, sabemos que as diversas funções desempenhadas pelos diferentes sistemas se complementam, para que o corpo humano funcione como um todo.

Considerando como exemplo o sistema circulatório, este tem como função o transporte de substâncias no interior do corpo humano de áreas anatómicas onde existem para



outras onde são necessárias. Este sistema é constituído pelo sangue, os vasos vasculares que o transportam, o coração que bombeia o sangue e um sistema linfático que faz regressar o plasma do sangue desde os tecidos aos vasos. Entre outras funções, o sangue transporta o oxigénio dos pulmões aos tecidos e no percurso inverso transporta o anidrido carbónico para ser expelido pelo sistema respiratório. Recolhe também do intestino delgado os nutrientes libertados pelos alimentos para os transportar aos tecidos onde fazem falta <sup>(3, p.:277-278)</sup>. Conforme podemos constatar pela descrição anterior, o sistema circulatório funciona em parceria e complementaridade com vários sistemas e órgãos, dos quais salientamos o sistema respiratório e o sistema digestivo.

A ocorrência de patologias no corpo humano leva à necessidade de métodos de diagnóstico e tratamento. De forma a tornar eficientes os procedimentos clínicos de diagnóstico e tratamento actualmente existentes e também para criar novas técnicas de diagnóstico e tratamento para patologias emergentes ou outras para as quais não existem ainda formas de combate, a medicina recorre-se da engenharia e de várias ciências para desenvolver instrumentação e métodos de aplicação clínica, assim como da farmacologia para o desenvolvimento de terapias e medicamentos. Cada uma das especialidades médicas em particular, recorre a grupos de investigação, muitas vezes multidisciplinares para desenvolver aplicações e optimizar métodos clínicos de diagnóstico e tratamento. Ao longo de várias décadas foram desenvolvidas técnicas e equipamentos à custa de esforços de investigadores clínicos, das diferentes ciências e da engenharia. Tais aplicações são utilizadas nas três formas de actuação médica: o diagnóstico, a terapia e a cirurgia. Em particular, muitas aplicações instrumentais que existem na Medicina actual são resultado da investigação de Físicos e Engenheiros. Muitas aplicações actuais resultaram da investigação e desenvolvimento de especialistas destas áreas. São disto exemplos a radioterapia <sup>(4) (5) (6)</sup>, a tomografia computadorizada <sup>(7)</sup>, a ressonância magnética <sup>(8)</sup>, a ecografia <sup>(9)</sup>, A radiografia de projecção <sup>(10)</sup>, a endoscopia <sup>(11)</sup> que utiliza tecnologias ópticas, o PET ou o SPECT <sup>(12)</sup> que utilizam as técnicas de física nuclear.

A Óptica Médica é um resultado específico desta parceria de investigação entre Físicos e Engenheiros. Vejamos como surgiu esta disciplina que apresenta aspectos promissores para o futuro de tecnologias em Medicina.

## 2.2 O nascimento da óptica médica

A investigação dedicada à aplicação das tecnologias ópticas em medicina, em particular, tem sido de grande interesse desde há várias décadas. O poder curativo da radiação óptica é conhecido desde há vários séculos, existindo referências a civilizações antigas como os Egípcios, os Hindus, os Romanos e os Gregos que atribuíam poderes terapêuticos à luz solar <sup>(13)</sup>. A contribuição da radiação óptica na medicina evoluiu através da história do homem e sofreu grande impulso com as revoluções científicas e tecnológicas <sup>(13)</sup>. Na primeira metade do século XX, vários estudos foram feitos e muitos textos foram apresentados referindo diferentes metodologias de diagnóstico por recorrência às tecnologias ópticas, destacando-se a espectroscopia na monitorização da hemoglobina, a observação de lesões mamárias e a quantificação de propriedades espectrais de vários tecidos biológicos <sup>(14, p.:4-6)</sup>. Estava a nascer a óptica médica. Esta ciência teve origem na investigação interdisciplinar realizada por físicos, médicos, biólogos e engenheiros <sup>(13)</sup>.

## 2.3 Tecnologias ópticas em medicina na actualidade

Diversas técnicas ópticas em medicina são actualmente uma realidade, salientando-se as técnicas mais recentes de fotodiagnóstico e fototerapia <sup>(15) (16)</sup>, de cirurgia laser <sup>(17)</sup>, de tomografia óptica coerente <sup>(18)</sup>, ou a microscopia <sup>(13)</sup> utilizada desde há alguns séculos. O grande interesse na aplicação das tecnologias ópticas em processos clínicos deve-se a que estes são minimamente invasivos e em geral encontram-se associados a uma instrumentação miniaturizada e de simples utilização. A Radiação óptica apresenta uma velocidade de propagação elevada (cerca de 300.000 km/s no vácuo <sup>(19)</sup>) e outras características que favorecem a sua aplicação em processos clínicos, conforme veremos. Em intervenções clínicas de tratamento e terapia tem-se verificado a vantagem da utilização das tecnologias ópticas. É o caso da soldadura de tecidos biológicos com lasers, onde ocorrem grandes reduções no tempo de intervenção, no tempo de recuperação dos tecidos soldados e nas hemorragias durante a intervenção por comparação com técnicas concorrentes, entre outros <sup>(20)</sup>. O Laser teve grande sucesso na sua aplicação em medicina visto que apresenta certas características favoráveis à sua utilização em processos cirúrgicos <sup>(21)</sup>: Coerência, monocromaticidade e colimação. A coerência indica que os fótons que emergem da cavidade laser se propagam em fase, a

colimação estabelece que eles mantêm trajectórias paralelas entre si e a monocromaticidade garante que todos têm o mesmo comprimento de onda <sup>(22)</sup>. As propriedades de colimação e coerência permitem ao laser ser focado com grande precisão num pequeno ponto espacial <sup>(21)</sup>. Esta possibilidade permite a realização de micro-cirurgia. Por outro lado, a junção de um laser cirúrgico com fibras ópticas integradas em endoscópios ou sistemas microscópicos de monitorização torna possível a realização de cirurgias localizadas em áreas anatómicas no interior do corpo humano, que de outra forma seriam difíceis de realizar ou impraticáveis <sup>(23)</sup>. O desenvolvimento de metodologias cirúrgicas e terapêuticas, com recurso às tecnologias ópticas tem sofrido um grande desenvolvimento nos últimos anos. São exemplos as técnicas cirúrgicas com laser na oftalmologia <sup>(24)</sup>, na dermatologia <sup>(25)</sup>, na urologia <sup>(22)</sup> e na otorrinolaringologia <sup>(26)</sup>, assim como as terapias com radiação ultravioleta <sup>(27)</sup> <sup>(28)</sup> em grande utilização na dermatologia.

### **2.3.1 Cirurgia Laser**

Considerando como exemplo o laser de CO<sub>2</sub> e devido à absorção, quase na totalidade, da radiação pelos tecidos moles, no ponto de focagem, pode utilizar-se este instrumento para proceder ao corte dos tecidos biológicos como se fosse um bisturi <sup>(29)</sup>. Por outro lado, as moléculas de água localizadas nos espaços intercelulares elevam a sua temperatura quando sob acção da radiação laser. Esta temperatura atinge facilmente o ponto de vaporização da água, levando à formação de depressões no tecido e também ao seu encolhimento <sup>(29)</sup>. As vantagens na utilização do laser CO<sub>2</sub> com um microscópio de monitorização em cirurgia relativamente a outras técnicas convencionais são a precisão cirúrgica, a preservação das estruturas anatómicas adjacentes, a redução de hemorragia durante a intervenção, a ausência de edema após intervenção, a redução substancial de dores por parte do doente, a recuperação otimizada das lesões e a minimização do tempo de internamento do doente <sup>(29)</sup>.

A criação de efeitos de transparência nos tecidos durante os procedimentos cirúrgicos poderá proporcionar alguns benefícios. O feixe colimado do laser cirúrgico ao ser inserido nos tecidos fica sujeito aos fenómenos de absorção e espalhamento originados pelas discontinuidades locais do índice de refração no interior do tecido. Como consequência desta atenuação, o feixe perde potência e colimação, o que restringe o seu campo de acção eficaz a profundidades superficiais. Com a criação de um efeito de

transparência temporário, consegue-se otimizar a colimação e a potência do feixe e aumentar a sua profundidade de actuação no interior do tecido. Esta vantagem poderá no futuro possibilitar a utilização de lasers com menores necessidades de potências e/ou cirurgia a profundidades superiores. A redução da potência óptica do laser implica uma diminuição de custos com a instrumentação. Por outro lado a maior colimação do feixe reduz o dano causado aos tecidos adjacentes à linha de acção cirúrgica, optimizando o processo. A maior colimação permitirá também o acesso a camadas de tecido mais profundas, possibilitando assim a execução de cirurgias de remoção de tumores que são actualmente impraticáveis. A aplicação de agentes osmóticos nos processos cirúrgicos motiva um grande interesse de estudo para o desenvolvimento de futuras aplicações onde poderão abrir-se novas possibilidades de cirurgia com custos instrumentais mais reduzidos.

### **2.3.2 Fotodiagnóstico e Fototerapia**

Um outro procedimento terapêutico que utiliza as tecnologias ópticas é a fototerapia. Neste método, é administrado ao doente um químico fotosensibilizante (químico que depois de activado opticamente gera substancias tóxicas que eliminam o tumor <sup>(16)</sup>) que através da corrente sanguínea se irá localizar preferencialmente na zona onde se encontra um tumor. O mecanismo que leva à localização preferencial do químico fotosensibilizante nos tumores não está ainda completamente explicado. Tanto quanto se sabe, esta localização preferencial, deve-se à existência nos tumores de receptores do tipo lipo-proteínas de baixa densidade em grande concentração, ao pH do tumor e também a uma vascularização permeável existente no tumor entre outros <sup>(16)</sup>.

Horas depois da administração do químico, o doente é submetido a uma monitorização por fotodiagnóstico. O tumor é detectado numa imagem vídeo, por intermédio da emissão fluorescente do fotossensibilizante quando activado por radiação óptica de baixo comprimento de onda, geralmente na banda do ultravioleta. O químico concentrado no tumor é excitado energeticamente quando activado por radiação óptica com comprimento de onda específico, geralmente na zona visível correspondente ao vermelho. No seu estado excitado, o químico fotosensibilizante gera entidades químicas citotóxicas que interagem com as moléculas circundantes do tecido. Tal interacção provoca danos irreversíveis ao tecido. Por outro lado, o fotosensibilizante no seu estado excitado transfere energia para o oxigénio molecular dos tecidos

circundantes, elevando-os para o seu primeiro estado energético excitado designado por singlete de oxigénio. Este ião é fortemente reactivo e pode interagir com um grande número de materiais biológicos levando em última instância à morte das células. Quer por um mecanismo, quer pelo outro, consegue-se uma reacção oxidante que em última análise leva à destruição do tumor <sup>(30)</sup>.

Existem vários agentes fotosensibilizantes (e outros estão a ser estudados) e por conseguinte diversos comprimentos de onda para a radiação de activação <sup>(15)</sup>. Os agentes fotosensibilizantes mais conhecidos são o Fotofrin e o Amino Levulinic Acid, que apresentam um comprimento de onda de activação a 630 nm. Para este comprimento de onda, os valores de profundidade de ocorrência da necrose tecidular variam entre 0.4 e 3.9 mm. Esta variação relaciona-se com a absorção típica dos tecidos onde a intervenção é feita. Aumentando o comprimento de onda da radiação de activação para 700 nm, conseguem-se profundidades de ocorrência da necrose com valores duplos dos anteriores. Por este facto se estão a desenvolver novos agentes fotosensibilizantes que possam ser activados a comprimentos de onda superiores a 700 nm <sup>(15)</sup>.

Nos processos de fotodiagnóstico e de fototerapia, poderão ser também aplicados os agentes osmóticos para a criação de efeitos temporários de transparência óptica. Dependendo da profundidade a que se localizam os tumores no interior dos tecidos, tanto o processo de fotodiagnóstico que se baseia na detecção da fluorescência do químico fotossensibilizante, como o processo de fototerapia que se baseia na activação do químico por radiação óptica apropriada, poderão não ser conseguidos apropriadamente. Estes processos implicam a passagem de radiação óptica por camadas de tecido que poderão ser bastante espessas. Neste tipo de situações, a criação de transparência nas camadas de tecido sobrepostas ao tumor possibilitará uma imagem de fluorescência de melhor qualidade e uma melhor passagem da radiação óptica de activação do químico fotossensibilizante.

### **2.3.3 TOC – Tomografia Óptica Coerente**

A Tomografia Óptica Coerente é a primeira tecnologia de diagnóstico por imagem que utiliza radiação óptica coerente. Trata-se de uma tecnologia recente que se encontra ainda em desenvolvimento e que ocupa uma grande parte da investigação em óptica médica actual. Foram já demonstradas diversas aplicações em diferentes áreas

anatômicas do corpo humano para a TOC. Uma dessas aplicações consiste na realização de biopsia óptica de tecidos. Esta tecnologia permite a obtenção de imagens com elevada resolução de secções transversais da estrutura interna dos tecidos vivos <sup>(31)</sup>. Por outro lado, é uma tecnologia de diagnóstico que não necessita de contacto físico entre a instrumentação utilizada e o doente, o que se traduz numa maior comodidade para o doente e maior facilidade de utilização para o clínico. Esta tecnologia envolve variada instrumentação óptica e electrónica, assim como técnicas de processamento que requerem uma descrição bastante exaustiva, pelo que iremos aqui apresentar apenas uma descrição resumida do seu funcionamento. O princípio de aquisição das imagens por tomografia óptica coerente baseia-se no processamento de um padrão de interferência de dois feixes ópticos. Uma fonte óptica emite um feixe de radiação que é separada por um divisor de feixe em dois feixes com iguais intensidades. Estes dois feixes tomam as designações de feixe de referência e feixe de sensorização, uma vez que o primeiro percorre um percurso óptico de referência perfeitamente caracterizado, enquanto que o segundo é focado para uma profundidade fixa no interior do tecido a estudar. O feixe de referência é reflectido num espelho localizado na extremidade do percurso óptico de referência. O feixe de sensorização é reflectido pela superfície de tecido localizada à profundidade de focagem do feixe, podendo realizar-se varrimento transversal do feixe sobre esta superfície do tecido. A radiação reflectida volta para o ponto onde o feixe original da fonte foi separado (tal como o feixe de referência). De volta a este ponto, os dois feixes interferem um com o outro, verificando-se uma diferença de fase no feixe de sensorização em relação ao feixe de referência. Note-se que este feixe viaja um percurso dentro do tecido igual a duas vezes a profundidade a que se encontra a camada onde foi focado. Neste percurso, o feixe sofre a atenuação imposta pelo material e sofre uma alteração de fase imposta pelas propriedades ópticas do meio. O padrão de interferência criado pode ser descrito por intermédio de uma equação de intensidade luminosa com vários termos. Um dos termos desta equação depende do atraso temporal introduzido no feixe de sensorização e representa a amplitude das linhas do padrão que contém a informação da estrutura da camada de tecido que reflectiu o feixe. Esta informação é processada pelos componentes da instrumentação que recolhe o padrão de interferência para ser possível representar a imagem da camada de tecido estudada <sup>(31)</sup>. A profundidade a que o feixe de sensorização pode ser focado dentro do tecido depende das propriedades ópticas do tecido em estudo. Em tecidos bastante transparentes, foram conseguidas profundidades

de focagem de 2 cm, enquanto que para tecidos com propriedades ópticas que produzem grande espalhamento, como por exemplo a pele, conseguem-se apenas reproduzir imagens de planos localizados entre 1 e 2 mm abaixo da superfície do tecido <sup>(31)</sup>.

Se considerarmos que o feixe de sensorização percorre dentro do tecido duas vezes a profundidade a que se encontra o plano de focagem do feixe, verificamos que devido ao espalhamento produzido nesse percurso, esta tecnologia é bastante limitada em termos de profundidades biológicas, tal como verificado nos exemplos apresentados. Assim sendo, a associação deste método de diagnóstico com a criação de efeitos de transparência temporária nos tecidos poderá permitir a focagem do feixe de sensorização em planos mais profundos dentro dos tecidos. Com a adaptação de índices de refração no interior dos tecidos e também pela sua desidratação estimulada pelo tratamento osmótico, o espalhamento é reduzido. Não só se consegue aumentar a profundidade de focagem do feixe, como também aumentar o contraste das imagens obtidas, conforme foi já descrito na literatura <sup>(32)</sup>.

O desenvolvimento recente das tecnologias ópticas em medicina deve-se em grande parte à criação recente de instrumentação opto electrónica adequada aos processos clínicos de diagnóstico, terapia e cirurgia, como os espectrofotómetros, os lasers e as fibras ópticas <sup>(33)</sup>. As necessidades específicas da medicina levaram à miniaturização de componentes e ao desenvolvimento de novas aplicações, como as descritas anteriormente. Dado o grande sucesso das aplicações actualmente em uso surgiu uma forte concorrência no mercado de produção de componentes, o que se traduz numa evidente redução de custos. Ao contrário do que acontecia há cerca de 50 anos é possível actualmente utilizar as tecnologias ópticas em ambientes biológicos de difícil acesso como o interior do corpo humano para procedimentos de diagnóstico, terapia e/ou cirurgia <sup>(16) (29)</sup>. Este facto é resultante da investigação aplicada que tem sido desenvolvida por inúmeras empresas e grupos de investigadores um pouco por todo o mundo. Embora esta nova actividade esteja em grande crescimento à escala global, verifica-se no nosso país um interesse inicial com um número muito reduzido de actividades de I&D em curso.

## 2.4 Propagação da radiação óptica em tecidos biológicos

O Ser Humano constitui uma entidade biológica complexa e composta por diferentes órgãos e sistemas, conforme referimos anteriormente. A existência de diferentes propriedades ópticas nos diversos materiais biológicos que constituem o corpo humano constitui um obstáculo à plena utilização das tecnologias ópticas em medicina<sup>(34) (35)</sup>. Estas propriedades condicionam a propagação da radiação óptica no interior dos materiais biológicos. À semelhança de outros materiais não biológicos, todas as estruturas vivas que compõem o corpo humano apresentam como características ópticas mais importantes o índice de refração, o coeficiente de absorção e o coeficiente de espalhamento. O índice de refração é um parâmetro estabelecido pela constituição do material e que permite identificar a velocidade de propagação da radiação óptica no seu interior<sup>(36)</sup>.

$$n = c/v \quad \text{Equação 1}$$

Na equação anterior, o parâmetro  $n$  representa o índice de refração do material, podendo ser uma constante real, ou assumir valores complexos. O parâmetro  $v$  representa a velocidade de propagação da radiação óptica dentro do material em estudo e finalmente o parâmetro  $c$  representa a velocidade de propagação da radiação óptica no vácuo.

O coeficiente de absorção corresponde à probabilidade que cada fóton tem de ser absorvido em pequenos percursos dentro do tecido<sup>(37, p:28-29) (38, p:5-6)</sup>.

$$p(\text{absorção}) = 1 - e^{-\mu_a \Delta S} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação,  $p(\text{absorção})$  representa a probabilidade de absorção do fóton pelo material no percurso reduzido  $\Delta S$ . O coeficiente de absorção é dado pelo parâmetro  $\mu_a$ . Comparativamente, o coeficiente de espalhamento permite calcular a probabilidade que cada fóton tem de ser desviado da sua direcção inicial de propagação em pequenos percursos dentro do tecido biológico<sup>(37, p:28) (38, p:17)</sup>.

$$p(\text{espalhamento}) = 1 - e^{-\mu_s \Delta S} \quad \text{Equação 3}$$



O parâmetro *p(espalhamento)* representa a probabilidade que o fóton tem de ser desviado da sua trajectória original para outra direcção no percurso reduzido  $\Delta S$ . O coeficiente de espalhamento é dado pelo parâmetro  $\mu_s$ . Estes parâmetros estão relacionados com outras grandezas importantes para avaliar a propagação da radiação no interior dos tecidos. Tais grandezas são o Albedo, a Profundidade Óptica e a Função de Fase. Tais grandezas encontram-se bem definidas na literatura <sup>(38, p:5-11)</sup> e não são importantes para o presente trabalho, pelo que não as iremos aqui considerar.

A interacção da radiação óptica com a matéria biológica origina assim os fenómenos de absorção e de espalhamento <sup>(35)</sup> que combinados causam a atenuação da radiação óptica <sup>(37, p:28)</sup>. Tais fenómenos interessam em algumas aplicações clínicas pontuais, mas na maioria dos casos limitam os objectivos de diagnóstico e tratamento, uma vez que um feixe de radiação óptica perde intensidade e colimação proporcionalmente à profundidade de penetração na matéria biológica <sup>(35)</sup>. Na maioria dos tecidos biológicos, verifica-se a elevada presença de moléculas de água nos espaços intercelulares <sup>(39) (40)</sup>. O valor do índice de refacção da água é da ordem de 1.33 na zona espectral do visível e encontra-se abaixo dos valores correspondentes para outras substâncias constituintes dos tecidos. As partículas de melanina, que se encontram maioritariamente na camada da epiderme, apresentam um índice de refacção de 1.6. Para certos tipos de tecido biológico analisados como um todo (tecidos do cérebro, aorta, pulmão, estômago, rim e bexiga) encontram-se entre 1.36 e 1.40. Certos fluidos extra celulares e o citoplasma no interior das células apresentam valores compreendidos entre 1.35 e 1.38. Para os tecidos de gordura o valor correspondente é de 1.45. As membranas que limitam as células e organelos subcelulares são compostas na sua maioria por lípidos. Entre o citoplasma e estes lípidos ocorre uma diferença de índice de refacção que está na origem da maioria do espalhamento que ocorre nos tecidos celulares <sup>(40)</sup>. Dentro das células também ocorre o espalhamento da radiação óptica devido aos organelos subcelulares. O seu tamanho varia entre aproximadamente 0.1 e 6  $\mu\text{m}$  e dentro desta escala de dimensões encontra-se a janela espectral terapêutica de comprimentos de onda. Os padrões de espalhamento originados por estes organelos (considerando o regime de espalhamento de Mie – regime de espalhamento para partículas esféricas, homogéneas e de qualquer diâmetro <sup>(41:306-307)</sup>) são fortemente anisotrópicos e pouco se desviam angularmente da direcção inicial, havendo pouco espalhamento lateral. As mitocôndrias inserem-se no grupo dos organelos e são os causadores dominantes do espalhamento da radiação óptica. A sua estrutura é semelhante a um cilindro e variam em tamanho dependendo do tipo de célula

onde se encontram. Os valores típicos de tamanho oscilam entre 0.5 e 2  $\mu\text{m}$  <sup>(40)</sup>. As células variam em forma e tamanho de tecido para tecido. Uma célula isolada pode causar grande espalhamento, mas dentro de um tecido, a origem do espalhamento ocorre maioritariamente a nível subcelular. No sangue, os eritrócitos são os constituintes que causam maior espalhamento. A sua forma é semelhante a um disco com uma espessura de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  e um diâmetro de 7 a 9  $\mu\text{m}$ . As propriedades de espalhamento do sangue dependem da fracção de volume dos eritrócitos e do seu grau de aglomeração. Os tecidos de suporte, constituídos por células e proteínas como a elastina e o colagénio, apresentam uma forte ligação mecânica e durabilidade. As propriedades de espalhamento destes tecidos têm origem em pequenas inomogeneidades e nas variações em grande escala nas estruturas que formam. O tamanho característico das variações de pequena escala é inferior ao comprimento de onda da radiação óptica, e o tipo de espalhamento é o de Rayleigh – regime de espalhamento em que as partículas apresentam diâmetros com valores inferiores ao comprimento de onda da radiação óptica por elas espalhada <sup>(41, p:306)</sup>. Como exemplo, as fibrilhas de colagénio apresentam uma estrutura orientada que produz espalhamento de Rayleigh e a separação média entre fibras é de 70 nm. Este valor é da ordem de 10 vezes inferior ao comprimento de onda da radiação óptica de diagnóstico <sup>(40)</sup>.

A absorção é outro obstáculo à propagação da radiação óptica dentro dos tecidos biológicos. Para comprimentos de onda dentro da chamada janela terapêutica (dos 600 aos 1300 nm), a maioria dos tecidos biológicos absorve pouco a radiação óptica e assim permite uma maior penetração no seu interior. No limite inferior de comprimentos de onda acima referidos, ocorre a absorção da hemoglobina, quer na sua forma oxigenada quer na forma desoxigenada. A absorção da forma oxigenada da hemoglobina aumenta aproximadamente duas ordens de grandeza com a diminuição do comprimento de onda na zona dos 600 nm. Para comprimentos de onda ainda menores, outras moléculas tomam um papel importante na absorção. É o caso do ADN e de alguns aminoácidos como a tirosina. Na zona limite superior da janela terapêutica (já no infravermelho), a penetração da radiação óptica é limitada pela absorção da água. No entanto, para esta gama de comprimentos de onda (600 a 1300 nm), o espalhamento é dominante em relação à absorção. Por conseguinte a radiação óptica que se propaga dentro dos tecidos torna-se algo difusa. A absorção que ocorre dentro dos tecidos é função da composição molecular destes. As moléculas absorvem os fotões quando a energia destes é igual a um intervalo energético entre estados quânticos e a transição entre estados obedece às

regras de selecção para o elemento em questão. Para os menores comprimentos de onda do espectro, estas transições são electrónicas <sup>(40)</sup>.

Abordamos de forma simplista as razões pelas quais existem dificuldades na propagação da radiação óptica dentro dos tecidos biológicos. Tais dificuldades são, de certa forma, um entrave à criação de novas tecnologias ópticas em medicina tanto para diagnóstico como para tratamento. A grande maioria das técnicas ópticas existentes actualmente apenas permite diagnósticos e/ou terapias a um nível considerado superficial, limitado pelas propriedades ópticas do material biológico. Note-se que pelos diversos tipos de tecidos do corpo humano, podem desenvolver-se tumores com dimensões muito variadas. Também a profundidade de localização dos tumores no interior dos tecidos pode variar. No caso da dermatologia, por exemplo, os tumores encontram-se à superfície ou a profundidades relativamente reduzidas, devido à espessura diminuta que a pele apresenta comparada com outros tecidos. Por outro lado, os tumores que se desenvolvem no interior dos seios femininos (o chamado cancro da mama) encontram-se no outro extremo quer em termos de dimensões, quer em termos de profundidade de localização. Para este caso particular, foram relatados casos de tumores que apresentam dimensões que variam desde valores inferiores a 5 mm até valores superiores a 5 cm. A sua localização pode situar-se 1 cm abaixo da superfície do seio, ou até mais. Foram publicados casos que apresentam profundidades de cerca de 8 cm para a localização dos tumores <sup>(42)</sup>.

Se considerarmos como exemplo hipotético um tumor de dimensão reduzida, que apresenta uma forma aproximadamente esférica e que se localiza a uma certa profundidade num tecido biológico poderemos encontrar sérias dificuldades quer no seu diagnóstico quer na sua remoção por cirurgia laser, ou qualquer método óptico de terapia. Se para esta patologia pretendermos recorrer a uma técnica de fotodiagnóstico, a informação recolhida representará quando muito uma secção transversal do tumor dada a profundidade limitada de penetração da radiação óptica e das imagens bidimensionais criadas por este método. A sua forma esférica tridimensional nunca será reconhecida por este processo, sendo necessário recorrer a outra técnica alternativa de diagnóstico. Mais ainda, se a profundidade dentro do tecido for considerável, então nem sequer será possível recolher qualquer informação por fotodiagnóstico, dado que a fluorescência emitida pelo tumor é absorvida pelas camadas de tecido a ele sobrepostas. Finalmente se assumirmos que um diagnóstico perfeito foi estabelecido, por técnicas ópticas ou outras, não será possível remover o tumor por cirurgia laser, mais uma vez pela incapacidade

de penetração da radiação óptica. Qualquer feixe laser que seja direccionado para seccionar ou vaporizar o referido tumor do tecido perde no seu percurso dentro do material biológico, maior ou menor eficácia (em termos de potência e colimação) dependendo da grandeza da profundidade a que se encontra o tumor. Se alternativamente pretendermos utilizar a fototerapia para eliminar este tumor, ficaremos mais uma vez limitados na inserção da radiação óptica necessária à activação do químico fotossensibilizante. O feixe de radiação óptica é atenuado por espalhamento e/ou absorção no percurso dentro do tecido acima do tumor, podendo nem sequer chegar ao local pretendido se a atenuação for total. Devido à forte atenuação da radiação óptica causada pelas propriedades ópticas dos materiais biológicos e suas variações espaciais verifica-se uma forte limitação no emprego das tecnologias ópticas actuais em medicina, assim como no desenvolvimento de novas aplicações de diagnóstico e tratamento. Esta dificuldade tecnológica imposta pelos materiais biológicos suscitou o interesse de diversos investigadores no sentido de desenvolverem técnicas para controlar as propriedades ópticas dos materiais biológicos com valores que reduzam o espalhamento e a absorção da radiação óptica.

## **2.5 Controlo das propriedades ópticas de materiais biológicos**

Como vimos na secção anterior, os materiais biológicos apresentam uma constituição heterogénea. Cada um dos constituintes apresenta um conjunto de propriedades ópticas característico devido à sua composição microscópica. Desse conjunto salientam-se o índice de refração, o coeficiente de absorção e o coeficiente de espalhamento. Estes três parâmetros variam de constituinte para constituinte dentro de um tecido ou material biológico. Dos vários constituintes, consideramos particularmente a água que se localiza nos espaços intersticiais e que em geral apresenta um índice de refração baixo comparado com o seu correspondente para os restantes constituintes. Nas fronteiras entre a água e os seus vizinhos sólidos, ocorre uma variação abrupta de índices de refração. Tal variação é responsável por uma forte atenuação que ocorre num feixe de radiação óptica que se faça introduzir no material. Tal atenuação é maioritariamente devida ao espalhamento <sup>(1, p:11)</sup>. A possibilidade de um processo de controlo das propriedades ópticas no interior dos tecidos biológicos permite reduzir a atenuação da radiação óptica e consequentemente otimizar a potência e colimação do feixe óptico a maiores profundidades. Tal redução é teoricamente possíveis se forem reduzidos os

coeficientes naturais de absorção e espalhamento do material biológico, o que se traduz impraticável de realizar de forma directa pois estes parâmetros são características naturais de cada material biológico e dependem da sua composição microscópica. De forma alternativa, reduzindo as variações localizadas do índice de refração que ocorrem no interior dos tecidos devido à sua constituição heterogénea, consegue-se diminuir o espalhamento e também alguma absorção. Este é o método utilizado nas técnicas que vamos descrever. A implementação de técnicas para este fim existe desde há alguns anos e permitirá melhorar as tecnologias ópticas de diagnóstico e cirurgia actuais, assim como desenvolver novas técnicas ópticas em medicina.

No sentido de superar as dificuldades impostas pela constituição heterogénea dos diversos materiais biológicos, vários investigadores preocuparam-se em desenvolver métodos capazes de controlar as propriedades ópticas no interior dos tecidos biológicos. Assim, e devido a diferentes linhas de investigação, conhecem-se actualmente quatro métodos distintos para diminuir temporariamente as diferenças internas das propriedades ópticas dos tecidos biológicos <sup>(1, p:12-18,193-212)</sup>. Tais técnicas são de simples explicação, pelo que iremos aqui apresentá-las, de forma a melhor podermos compreender a importância e inovação do trabalho que realizamos.

O primeiro método de controlo das propriedades ópticas no interior dos tecidos biológicos que aqui descrevemos consiste na alteração da sua temperatura por processos induzidos externamente. Muitas aplicações dos lasers em medicina baseiam-se nos efeitos fototérmicos induzidos pela absorção da radiação óptica pelos constituintes dos tecidos. Dois efeitos importantes em terapia cirúrgica são a fotocoagulação e a ablação fototérmica. Em ambos os casos, as propriedades ópticas dos tecidos tem um papel muito importante. O espalhamento da radiação óptica dentro dos tecidos biológicos influencia fortemente a distribuição da radiação óptica no interior dos tecidos, enquanto que a conversão local de energia dos fótons em energia térmica depende da absorção do tecido <sup>(43)</sup>. Vários estudos se tem feito para descrever e otimizar os processos que envolvem as alterações das propriedades ópticas dos tecidos biológicos devido a alterações térmicas que ocorrem inerentemente ao processo terapêutico. Em alguns destes estudos, verificou-se experimentalmente que ocorrem variações quer a nível das propriedades ópticas dos tecidos, quer a nível de organização interna dos seus constituintes devido a variações de temperatura induzidas externamente. Estudos realizados em amostras de derme humana e outras camadas de tecido mais profundas numa situação *in vitro* demonstraram que o coeficiente de espalhamento reduzido varia

com a temperatura na zona do infravermelho próximo para uma gama de temperaturas entre 25 e 40°C <sup>(1, p:206)</sup>. Mais especificamente, como resultado destes estudos verificou-se que a derme apresenta um aumento naquele coeficiente de  $[(4.7 \pm 0.5) \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}]$ , enquanto que para as camadas abaixo da derme se verifica uma diminuição de  $[(-1.4 \pm 0.28) \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}]$ . Foi formulada uma explicação para o tipo de variação verificado às duas profundidades da pele: Pressupôs-se que os constituintes das camadas abaixo da derme que produzem maior espalhamento são lípidos localizados em membranas e vacúolos e sabe-se que estes passam por transições de fase a certas temperaturas, que alteram a sua orientação, mobilidade e organização física. Os glicolípidos que se encontram nas membranas das células humanas ficam sujeitos a transições de fase se ocorrerem variações de temperatura entre 25 e 45 °C, principalmente a transição entre o estado de gel para uma fase líquida-cristalina, passando por um fase cristalina estável intermédia quando ocorre um aumento de temperatura. A diminuição verificada experimentalmente para o coeficiente de espalhamento com o aumento de temperatura é consistente com um aumento da fluidez que se sabe ocorrer nos lípidos com o aumento da temperatura <sup>(1, p:206)</sup>. É um facto conhecido, que a perda de água pelos tecidos devido a efeitos de temperatura, como o congelamento a baixas temperaturas ou o aquecimento devido à não coagulação influencia fortemente as propriedades ópticas internas da matéria biológica <sup>(1, p:208)</sup>. Considerando como exemplo, num estudo realizado com a aorta humana, o coeficiente de absorção aumentou entre 20% e 50%, especialmente na zona de radiação óptica visível, quando o tecido perdeu 4.6% da sua massa como resultado de desidratação provocada por um congelamento prolongado a baixas temperaturas. Esta perda de massa foi acompanhada por uma diminuição de espessura de 19.5%. Em primeira análise, devido à diminuição de espessura, porque se produz uma organização interna mais densa dos componentes do tecido, ocorreu um aumento do coeficiente de absorção na banda entre os 400 e 1300 nm. Ocorreu também um pequeno aumento de 2 a 15% do coeficiente de espalhamento reduzido na banda espectral visível, mais uma vez devido à nova organização interna dos componentes do tecido <sup>(1, p:208)</sup>.

A segunda técnica para controlo das propriedades ópticas dos tecidos consiste em induzir tensões mecânicas nos tecidos para que a sua organização interna seja alterada para reduzir o espalhamento <sup>(1, p:193)</sup>. Trata-se de um método simples de reduzir as discrepâncias localizadas nas propriedades no interior do tecido. É um facto conhecido que a compressão de um tecido na sua direcção paralela à injeção de radiação óptica ou

extensão nas direcções transversas origina um aumento na transmitância óptica natural desse tecido. Foi já explicado <sup>(1, p:193)</sup> que tal aumento se deve maioritariamente a três razões: a) Uma maior homogeneidade óptica no interior do tecido, devido à remoção de sangue e fluidos intersticiais da zona sujeita à compressão; b) Uma maior compactação dos constituintes internos do tecido diminui o espalhamento devido a efeitos cooperativos; c) Menor espessura do tecido a atravessar pela radiação óptica.

Embora se tenha estudado os efeitos ópticos criados em diversos tipos de tecido pela compressão induzida externamente, verifica-se a existência de uma inércia acentuada em tecidos com pouca presença de sangue, como por exemplo a esclerótica. Tal inércia apresenta uma duração de alguns minutos devido à diminuta capacidade de difusão da água da área sujeita à compressão para as zonas circundantes <sup>(44)</sup>. Apesar de tal característica, após alguns minutos do início de compressão do tecido, começa a notar-se a criação de um efeito de transparência óptica. Para além da reorganização interna do tecido que proporciona a criação de uma transparência, verifica-se também uma diminuição de espessura. Tal aspecto traduz uma maior concentração efectiva de elementos que produzem espalhamento, e por conseguinte um maior coeficiente de espalhamento efectivo para o tecido comprimido. No entanto, o efeito global que traduz a alteração das propriedades ópticas internas do tecido, que é proporcional ao produto entre o coeficiente de espalhamento pela espessura do tecido em estudo é caracterizado por um menor espalhamento <sup>(1, p:193)</sup>. Se por outro lado, considerarmos aplicações clínicas em que a medição da radiação é feita sobre os tecidos à reflexão, então, este método tem grande aplicação. Um tecido não apresenta uma superfície perfeitamente plana. Apresenta rugosidades superficiais que variam a nível microscópico em termos de forma e amplitude. Se o tecido for submetido a forças de extensão, então torna-se mais plano e suave, resultando numa maior capacidade de reflexão <sup>(1, p:205)</sup>.

O branqueamento de tecidos consiste num outro método que produz um aumento de contraste em imagiologia <sup>(1, p:211)</sup>. Em certos casos de imagiologia clínica de componentes intracelulares de tecidos do epitélio, torna-se adequado o uso desta técnica. O branqueamento de núcleos das células de cancro do tipo carcinoma basal aumenta o contraste e melhora significativamente a capacidade de detecção da sua morfologia. Em condições normais, o núcleo contém uma rede de filamentos finos que apresentam diâmetros que variam entre os 30 e os 100 nm e ocupam um volume reduzido. Devido às dimensões reduzidas e também às pequenas diferenças entre o índice de refração destas fibras (valor estimado de 1.39) e dos componentes

circundantes do tecido como o citoplasma celular e os fluidos intersticiais (com um índice de refração de 1.35), a sua reflectividade é pequena. O ácido acético proporciona a combinação das finas fibras em cordões de fibras com diâmetros entre 1 e 5  $\mu\text{m}$ . Esta disposição de fibras ocupa um volume significativo no interior do núcleo celular, sendo de esperar um aumento do seu índice de refração. Desta forma, ocorre um aumento na radiação óptica reflectida pelos núcleos das células que nas imagens formadas aparecem brilhantes. Foram estudadas amostras de epiderme humana *in vitro*, que depois de imersas numa solução de 5% de ácido acético durante 3 minutos, apresentavam núcleos celulares brilhantes em imagens produzidas por microscopia de reflexão confocal. Este processo de branqueamento dos núcleos celulares atinge o seu máximo durante os 2 primeiros minutos e posteriormente diminui durante os 5 a 10 minutos seguintes. Segundo estes estudos, e dos tempos verificados para a criação do contraste e posterior recuperação, torna-se possível criar uma janela clínica temporal para proceder a um diagnóstico efectivo das células cancerígenas. Outros tipos de solução foram também estudados para a criação deste efeito, embora o ácido acético apresente os melhores resultados na sua concentração de 5% <sup>(1, p:211)</sup>.

Finalmente, a criação de efeitos de transparência temporários e reversíveis em tecidos biológicos por adição de agentes químicos bio-compatíveis e hiper-osmóticos constitui a outra técnica que se conhece para controlar as propriedades ópticas internas dos tecidos biológicos. Trata-se de um método cujos benefícios para aplicações clínicas com utilização das tecnologias ópticas são conhecidos há relativamente pouco tempo. Devido ao grande potencial que estes agentes apresentam para as tecnologias ópticas em medicina actuais e eventualmente para o desenvolvimento de novas aplicações clínicas, uniram-se grandes esforços neste campo de investigação e desenvolvimento. Por apresentarem vantagens significativas relativamente às técnicas apresentadas anteriormente e por ser este o método que iremos estudar experimentalmente, vamos descrever de forma mais exhaustiva os seus efeitos, características, tipos de agentes e teorias explicativas da sua acção dentro dos tecidos na secção seguinte.

## **2.6 Criação de efeitos temporários de transparência por recurso a agentes osmóticos**

Trabalhos de investigação relativamente recentes revelaram que as dificuldades anteriormente mencionadas podem, de certa forma, ser ultrapassadas com a ajuda de



agentes químicos inócuos aos tecidos biológicos. Estes agentes químicos são utilizados como líquidos de imersão para os tecidos biológicos que pretendemos submeter a técnicas ópticas de diagnóstico ou tratamento. Trata-se de uma técnica muito utilizada na óptica dispersiva de sistemas físicos e foi inicialmente aplicada entre 1950 e 1970 a células e microorganismos para estudos de microscopia de fase <sup>(45)</sup>. Para além deste método, podem alterar-se as propriedades ópticas de certos materiais biológicos por outras técnicas <sup>(1, p:193-212)</sup> como anteriormente foi descrito.

Os agentes químicos de imersão estão designados como soluções químicas bio compatíveis e hiper-osmóticas e são essencialmente soluções electrolíticas, açúcares ou alcoóis <sup>(1, p::x)</sup>. Estas soluções tomam esta designação devido a se difundirem dentro da matéria biológica, de zonas onde existem em grande concentração para outras onde a sua concentração é inferior por intermédio de membranas permeáveis à sua passagem <sup>(2, p:551)</sup>.

A difusão das soluções para o interior dos tecidos estimula a remoção de água no espaço intercelular do material biológico, e consequente ocupação desse espaço pelas moléculas do agente <sup>(45)</sup>. Trata-se pois de um processo complexo que envolve a difusão de água para o exterior e a difusão do agente ao interior do tecido. Estes agentes apresentam um valor de índice de refração superior ao da água e próximo do valor correspondente para os constituintes sólidos no interior dos tecidos <sup>(46)</sup>. Com esta difusão do agente para o interior do tecido e devido às consequentes desidratação e adaptação de índices de refração cria-se temporariamente nos materiais biológicos um efeito de transparência óptica que se traduz numa maior penetração da radiação e redução do seu espalhamento <sup>(46)</sup>. Assim sendo, a investigação em óptica médica permite novas perspectivas, podendo actualmente imaginar-se um conjunto variado de aplicações futuras que permitirão efectuar diagnósticos e tratamentos por métodos ópticos minimamente invasivos em camadas de tecidos localizadas a maiores profundidades e que até há relativamente pouco tempo não eram possíveis. A utilização destes agentes poderá também ser benéfica em procedimentos de cirurgia laser, se considerarmos casos clínicos como o que foi anteriormente apresentado para um tumor localizado a alguma profundidade. Tal poderia ocorrer com uma maior penetração da radiação laser de cirurgia, cortando com precisão em volta do tumor. Diversas soluções químicas foram já estudadas no sentido de averiguar a criação deste efeito óptico em alguns tecidos biológicos como a pele, tecido fibroso como a esclerótica, tecido intestinal ou a retina <sup>(46)</sup>. Estudos com soluções de Propileno Glicol, Anilina, Glicerina,

Gel dermatológico de Aloé Vera, Glucose, produtos contrastantes para raios-X e ultrasons têm revelado tempos de resposta para a criação do efeito de transparência muito variados, consoante o agente utilizado e as propriedades biológicas, ópticas e mecânicas do tecido biológico em estudo. Em diversas publicações são apresentados estes tempos de resposta para variados agentes, quando aplicados em diferentes tipos de tecidos biológicos <sup>(1, p:47-50) (46) (47) (48)</sup>. Para o caso de uma amostra de epiderme com camadas de gordura imersa em Glicerina, não se verifica a ocorrência de saturação do efeito de transparência durante um período de 6 horas de tratamento <sup>(45)</sup>. Com a remoção das camadas de gordura é conseguida a saturação do efeito ao fim de uma hora <sup>(45)</sup>.

A desidratação que ocorre no interior do material biológico proporciona a contracção do mesmo, uma vez que grande parte do volume biológico se deve à presença de água <sup>(46)</sup>. A saturação do efeito de transparência irá ocorrer ao fim de um período de tempo limitado devido à finalização dos processos de desidratação do tecido e da inserção do agente nos espaços deixados pela água para adaptação de índices de refacção no interior do tecido. Estes fluxos de água para o exterior e de agente para o interior dos tecidos em estudo terminam quando se atinge o equilíbrio de concentrações para ambos entre o interior do tecido e o espaço circundante <sup>(45)</sup>. Este aspecto significa que um equilíbrio de concentrações foi atingido e que o processo osmótico de difusão não ocorre mais. Esta limitação temporal deve ser tomada em conta no desenvolvimento de aplicações com estes agentes.

O processo de desidratação dos tecidos biológicos é reversível, como é descrito na literatura <sup>(46) (49)</sup>. Também para os outros processos de controlo das propriedades ópticas dos tecidos como as alterações de temperatura se verifica uma reversibilidade do processo <sup>(44)</sup>. Para tecidos estudados *in vivo*, a água ou outros fluidos como o citoplasma deverão difundir-se naturalmente das zonas circundantes para o local onde o agente osmótico se inseriu ao fim de algum tempo. Para os tecidos estudados *in vitro*, poderá verificar-se a reversibilidade do processo por adição assistida de água aos tecidos.

Como anteriormente foi dito e de acordo com estudos publicados, verifica-se uma descontinuidade de índices de refacção no interior dos materiais biológicos devido à presença de água. Para o caso de um músculo humano, sabemos que é constituído por fibras musculares, que apresenta um índice de refacção de 1.410 e que no espaço inter fibras se encontra preenchido por moléculas de água com um índice de refacção de 1.330 <sup>(40)</sup>. Esta variação abrupta de índices contribui fortemente para o espalhamento que ocorre quando um feixe laser é feito incidir num músculo. Substituindo as

moléculas de água por outro composto químico inofensivo para os constituintes do músculo com um índice de refração superior consegue-se uma redução no espalhamento da radiação inserida no músculo. Um bom exemplo consiste na adição de Propileno Glicol que apresenta um índice de refração de 1.43 no seu estado puro <sup>(1, p:34)</sup>. Embora este valor seja superior ao das fibras musculares, a proximidade entre os dois valores é grande em comparação com diferença verificada no caso da água. Na tabela seguinte figuram os valores dos índices de refração medidos para alguns tecidos biológicos humanos, assim como os comprimentos de onda aos quais se referem as medições. Os valores representados foram medidos recorrendo a técnicas distintas e por diferentes investigadores <sup>(1, p:135-142)</sup>.

Tabela 1: Valores médios medidos experimentalmente para o índice de refração de materiais biológicos humanos

<b>Tecido</b>	<b><math>\lambda</math>, nm</b>	<b>n</b>
Aorta normal:		
Intima	456 – 1064	1.39
Media	456 – 1064	1.38
Adventícia	456 – 1064	1.36
Bexiga:		
Mucosa	456 – 1064	1.37
Parede	456 – 1064	1.40
Global	456 – 1064	1.38
Cérebro:		
Matéria cinzenta	456 – 1064	1.36
Matéria branca	456 – 1064	1.38
Matéria branca e cinzenta	456 – 1064	1.37
Colon:		
Músculo	456 – 1064	1.36
Sub mucosa	456 – 1064	1.36
Mucosa	456 – 1064	1.38
Global	456 – 1064	1.36
Tecido peitoral feminino:		
Normal	800	1.403

Maligno	800	1.431
Esófago:		
Mucosa	456 – 1064	1.37
Gordura:		
Subcutânea	456 – 1064	1.44
Abdominal	456 – 1064	1.46
Coração:		
Trabécula	456 – 1064	1.40
Miocárdio	456 – 1064	1.38
Veia Femoral	456 – 1064	1.39
Rim	456 – 1064 633	1.37 1.417
Fígado	456 – 1064 633	1.38 1.367
Pulmão	456 – 1064	1.38
Músculo	456 – 1064	1.37
Pele:		
Camada Córnea	1300	1.51
Epiderme	1300	1.41
Derme	1300	1.34
Baço	456 – 1064	1.37
Estômago:		
Músculo	456 – 1064	1.39
Muco	456 – 1064	1.38
Global	456 – 1064	1.38
Fluído espinal cerebral	400 – 700	1.335
Olho:		
Humor aquoso	400 – 700	1.336
Córnea:		
Global	400 – 700	1.376

Fibrilhas	400 – 700	1.47
Substância envolvente	400 – 700	1.35
Lente:		
Superfície	400 – 700	1.386
Centro	400 – 700	1.406
Humor Vítreo	400 – 700	1.336
Lágrimas	400 – 700	1.3361 – 1.3379
Esclerótica	442 – 1064	1.47 – 1.36
Córnea:		
Fibrilhas	589	1.411
Material Extra fibrilhas	589	1.365
Dente Humano:		
Esmalte	220	1.73
Esmalte	400 – 700	1.62
Hidroxiapatite	400 – 700	> 1.623
Matriz da Dentina	Visível	1.553
Esmalte	856	1.62
Dentina	856	1.50
Esmalte	850	1.65
Dentina	850	1.54
Unha Humana	850	1.51
Cabelo Humano:		
Preto	850	1.59
Castanho	850	1.58
Ruivo	850	1.56
Loiro	850	1.57
Cinzento	850	1.58
Branco	850	1.58
Sangue Humano como um todo	633 488 632.8 1079.5	1.400 1.395 1.373 1.363

	1341.4	1.360
Plasma do sangue humano	488	1.350
	632.8	1.345
	1079.5	1.332
	1341.4	1.327
Glóbulos vermelhos (secos):		
Sujeitos saudáveis	550	1.61-1.66
Doentes diabéticos	550	1.56-1.62
Hemoglobina:		
Com Glucose (Glucose em densidade de 40 to 400 mg/dl)	820	1.382→1.415
Com Glucose (Glucose em densidade de 400 to 800 mg/dl)	820	1.415→1.385
Citoplasma	400 – 700	1.350 –1.367

A tabela anterior contém dados experimentais recolhidos de uma tabela mais completa do livro *Optical Clearing of Tissues and Blood* do Professor Valery Tuchin com a devida permissão. Nesta tabela são apresentados apenas alguns valores que consideramos importantes. Outros conjuntos de dados mais completos encontram-se descritos na literatura <sup>(1, p:135) (34)</sup>.

Como anteriormente referimos, a maioria dos tecidos biológicos, os chamados tecidos moles, apresenta uma configuração interna composta por constituintes sólidos de elevado índice de refração que se encontram rodeados por líquido intersticial de índice de refração consideravelmente inferior. Geralmente, este líquido é a água. Nem sempre esta descrição simplista corresponde à realidade. Certos casos reais apresentam-se mais complexos do que o que foi descrito, tornando-se necessário recorrer a uma abordagem estatística <sup>(1, p:1-18)</sup>.

A criação de efeitos temporários de transparência nos tecidos biológicos à custa da administração de agentes osmóticos consiste num processo em duas fases, conforme já nos pudemos aperceber. Em primeiro lugar, após a administração do agente osmótico ao

tecido, seja por imersão, por aplicação tópica ou por injeção local, é criada uma pressão osmótica sobre o interior do tecido. Tal pressão induz por pressão hidrostática o fluxo de água para o exterior <sup>(1, p:19)</sup>. O espaço deixado pelas moléculas de água pode agora ser ocupado pelo agente osmótico que se difunde do exterior para o interior do tecido. Com esta inserção do agente osmótico para o interior do tecido, poderão ocorrer variações nas dimensões físicas dos constituintes sólidos. Se estes se contraírem devido à pressão do agente que se localiza nos espaços intermédios, então pode observar-se um efeito macroscópico de contracção do tecido. Sabe-se também que existe uma relação de correspondência entre o valor do pH dos tecidos e o seu grau de contracção <sup>(1, p:19)</sup>. Desta forma, com a ocorrência de variações de dimensão dos tecidos tratados osmoticamente, é de esperar que ocorram variações no seu pH. Por outro lado, o pH deverá variar também devido à desidratação do tecido e pela inserção do agente no espaço intersticial. Basta considerarmos que o pH da água é superior ao seu correspondente para os agentes e que os processos de desidratação e difusão do agente para o espaço intersticial envolve o fluxo de grandes quantidades tanto de água como de agente. A difusão do agente para o interior do tecido ocorre até que seja atingido um equilíbrio de concentrações entre o interior e o exterior, quer para o agente administrado quer para a água.

Opticamente podem detectar-se os efeitos temporários de transparência por várias formas, como por exemplo medições espectrais de absorção, transmissão ou reflexão. Em geral, a escolha da técnica de estudo do efeito criado prende-se com o tecido que iremos estudar e o seu estado vital aquando do estudo. Se pretendermos realizar um estudo *in vivo*, é mais conveniente medir espectros em reflexão, dada a impossibilidade de colocar o sistema detector (ou de iluminação) no interior do organismo, por baixo do tecido a estudar.

O processo de difusão do agente para o interior do tecido pode ser descrito matematicamente se conhecermos o correspondente coeficiente de difusão do agente dentro da matéria biológica. Para a maioria dos agentes osmóticos utilizados actualmente para a criação de efeitos de transparência são conhecidos os valores deste coeficiente. Na secção seguinte iremos descrever como ocorre o processo de difusão dos agentes osmóticos para o interior dos tecidos, assim como apresentaremos para alguns agentes osmóticos as suas características e em particular o seu coeficiente de difusão.

## 2.7 Difusão de um agente para o interior da matéria biológica

Com a realização de diversos estudos dos efeitos criados por agentes osmóticos em tecidos biológicos de diferente natureza, foi possível criar um modelo que descreve como se difunde um composto químico osmótico para o interior de tecidos biológicos para criar um efeito temporário de transparência <sup>(50)</sup>. Tal descrição considera a natureza do tecido, discriminando entre os tecidos fibrosos e outros que são compostos por membranas onde irá ocorrer a difusão. Considerando condições iniciais bem determinadas e conhecendo-se o coeficiente de difusão do agente no interior do tecido, é possível avaliar a variação temporal de concentração do composto em profundidades distintas dentro do tecido. Esta variação temporal de concentração é representativa da variação temporal do efeito de transparência em criação durante o processo de difusão do agente.

Dada a estrutura fibrosa de certos tecidos como a esclerótica ou o músculo, considera-se que a difusão de fluidos no seu interior se comporta como uma difusão livre, por não estar condicionada por membranas. Desta forma, a variação local de concentração de fluido dentro de uma camada de tecido pode ser descrita pela equação de difusão <sup>(50)</sup>:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \times \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{Equação 4}$$

Na equação 4, consideramos que  $C$  é a concentração do fluido,  $D$  é o coeficiente de difusão do fluido e  $x$  a coordenada espacial dentro do tecido. Esta é uma equação de 2ª ordem, onde se relaciona o deslocamento espacial do fluido dentro do tecido com o tempo decorrido desde o início da difusão. Esta relação matemática é aplicável a casos em que a taxa de variação da concentração não é limitada por membranas, tal como acontece na difusão de substâncias no espaço intersticial ou quando uma substância em solução apresenta uma taxa elevada de penetração em membranas. A solução da equação anterior, para uma secção plana de tecido biológico fibroso de espessura  $l$ , que é colocada no instante  $t=0$  numa solução com concentração  $C_0$  (a concentração inicial desta substância dentro da lâmina de tecido é igual a 0, i. e., para  $t=0$  e  $0 \leq x \leq l$ :  $C=0$ ) tem a forma <sup>(50)</sup>:



$$C = C_0 \left\{ 1 - \frac{4}{\pi} \left[ \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \times \sin\left(\frac{\pi x}{l}\right) + \left(\frac{1}{3}\right) \times \exp\left(-\frac{9t}{\tau}\right) \times \sin\left(\frac{3\pi x}{l}\right) + \left(\frac{1}{5}\right) \times \exp\left(-\frac{25t}{\tau}\right) \times \sin\left(\frac{5\pi x}{l}\right) + \dots \right] \right\}$$

Equação 5

com,

$$\tau = \frac{l^2}{\pi^2 D}$$

Equação 6

O quociente da quantidade de matéria dissolvida  $m_t$  no instante  $t$  relativamente ao seu valor de equilíbrio  $m_\infty$  é definido como <sup>(50)</sup>:

$$\frac{m_t}{m_\infty} = \frac{\left(\int_0^l C dx\right)}{C_0 l} = 1 - \left(\frac{8}{\pi^2}\right) \left\{ \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + \left(\frac{1}{9}\right) \times \exp\left(-\frac{9t}{\tau}\right) + \left(\frac{1}{25}\right) \times \exp\left(-\frac{25t}{\tau}\right) + \dots \right\}$$

Equação 7

As equações 5,6 e 7 permitem determinar a dependência temporal da concentração dos agentes químicos com um peso molecular baixo à profundidade  $x$  dentro do tecido ou variações temporais da quantidade total relativa destes agentes no interior de uma amostra de tecido se conhecermos o coeficiente de difusão  $D$  das moléculas de agente dentro do tecido em causa. Por outro lado, se medirmos os parâmetros  $C(t)$  e  $m_t(t)$  é possível determinar o valor de  $D$  para as moléculas do agente que se introduziu no espaço intersticial do tecido. Para compostos com peso molecular baixo, o valor do seu coeficiente de difusão dentro do seu próprio meio é de cerca de  $10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ; para a água  $D=2.5 \times 10^{-5}$  e para a sacarose  $D=0.5 \times 10^{-5}$  <sup>(50)</sup>. Outros tipos de compostos químicos apresentam coeficientes de difusão bastante distintos, conforme podemos verificar na tabela 2 abaixo. Esta tabela apresenta os valores do coeficiente de difusão para compostos estudados em alguns tecidos distintos.

A descrição que apresentamos para a difusão de um agente para o interior de um tecido biológico é a adequada para o caso de tecidos fibrosos, em que o processo pode ser considerado como uma difusão livre. No entanto, para outros tipos de tecido biológico não fibrosos, o processo requer outros tipos de descrição <sup>(50)</sup>. Nesses casos, a difusão do agente é feita através de membranas no tecido que podem ser perfeitamente permeáveis ou apenas semipermeáveis ao agente em causa. Uma vez que vamos estudar

experimentalmente tecido muscular, não vamos preocupar-nos com outros processos de difusão, para além do que acima foi descrito.

Tabela 2. Coeficientes de Difusão de agentes químicos em tecidos <sup>(1, p:44-45)</sup>

Tecido	Agente químico	Concentração	pH	$D_a$ , cm <sup>2</sup> /seg, (média ± dp, a 20°C)	$D_a$ , cm <sup>2</sup> /seg, (média ± dp, a 37°C)	Comentários
Esclerótica Humana	Glucose	0.18 g/ml	6.3	$(0.57 \pm 0.09) \times 10^{-6}$	$(0.93 \pm 0.15) \times 10^{-6}$	Espessura da amostra, $d = 0.50 \pm 0.01$ ; $0.51 \pm 0.02$ , e $0.48 \pm 0.02$ mm, respectivamente; extrapolação para 37°C.
		0.3 g/ml	6.0	$(1.47 \pm 0.36) \times 10^{-6}$	$(2.39 \pm 0.58) \times 10^{-6}$	
		0.4 g/ml	3.5	$(1.52 \pm 0.05) \times 10^{-6}$	$(2.47 \pm 0.08) \times 10^{-6}$	
		40%	3.5	$(3.45 \pm 0.46) \times 10^{-6}$	$(5.61 \pm 0.75) \times 10^{-6}$	$d = 0.51$ , extrapolação para 37°C.
		40%	3.5	$(5.62 \pm 1.64) \times 10^{-6}$	$(9.19 \pm 2.67) \times 10^{-6}$	$d = 0.5$ ; extrapolação para 37°C.
		40%	3.5	$(1.29 \pm 0.23) \times 10^{-6}$	$(2.06 \pm 0.37) \times 10^{-6}$	$d = 0.5$ ; extrapolação para 37°C.
		72%	-	$(1.50 \pm 0.53) \times 10^{-6}$	$(2.44 \pm 0.86) \times 10^{-6}$	$d = 0.5$ ; extrapolação para 37°C.
		40%	3.5	$(1.7 \pm 0.06) \times 10^{-6}$	$(2.76 \pm 0.10) \times 10^{-6}$	$d_1 = 1.10 \pm 0.01$ mm, $d_2 = 0.52 \pm 0.01$ mm, extrapolação para 37°C.
		0.72 g/ml	-	$(1.14 \pm 0.08) \times 10^{-6}$	$(1.85 \pm 0.13) \times 10^{-6}$	
	Propileno Glicol	100%	7.2	$(2.05 \pm 0.10) \times 10^{-8}$		$d = 1.00 \pm 0.01$ mm, tecido fixo.
	Trazograph-60 (designação inglesa)	100%	-	#1 $(1.46 \pm 0.19) \times 10^{-5}$ #2 $(0.40 \pm 0.11) \times 10^{-5}$ #3 $(0.53 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ #4 $(1.20 \pm 0.10) \times 10^{-5}$		$d = 0.5$ mm (#1 e #2) e 0.4 mm (#3 e #4)
	Verografín-76 (designação inglesa)	100%	7.2	$(0.32 \pm 0.01) \times 10^{-6}$		$d = 0.49 \pm 0.01$ mm, tecido fixo.
Esclerótica Bovina	Glucose	45%	-	$(2.18 \pm 1.50) \times 10^{-5}$	$(3.54 \pm 2.44) \times 10^{-5}$	Média de 5 amostras; extrapolação para 37°C.
	PEG (6000)	80%	-	$(1.94 \pm 1.52) \times 10^{-5}$		Média para 4 amostras.
Lente do olho humano	D <sub>2</sub> O	-	-	#1 $3.88 \times 10^{-6}$ #2 $0.90 \times 10^{-6}$ #3 $3.57 \times 10^{-6}$ #4 $3.53 \times 10^{-6}$		Espectroscopia Confocal Raman, amostras #1-4 - intactas e #5

				#5	$0.75 \times 10^{-6}$		– fixa.
Dura-máter Humana	Mannitol (designação inglesa)	0.16 g/ml	6.05	$(1.31 \pm 0.41) \times 10^{-6}$	$(2.08 \pm 0.65) \times 10^{-6}$		Extrapolação para 37°C.
	Glucose	0.2 g/ml	5.99	$(1.63 \pm 0.29) \times 10^{-6}$	$(2.59 \pm 0.46) \times 10^{-6}$		
Pele de rato	Glicerina	88%	6.32	$(5.12 \pm 2.27) \times 10^{-7}$	$(8.31 \pm 3.70) \times 10^{-7}$		Extrapolação para 37°C. Media para 6 amostras. Ambos os lados da pele, epiderme e derme, interagiram com o agente.
	Glucose	40%	3.5	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ $(3.1 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ $(3.3 \pm 0.7) \times 10^{-6}$			$d_1=0.73$ mm Pele com camada de gordura; $d_2=0.70$ mm e $d_3=0.57$ mm Pele sem camada de gordura.
Pele de rato ( <i>in vivo</i> )	Glicerina	88%	6.32		$(1.16 \pm 0.03) \times 10^{-6}$		
	Glucose	40%	3.5		$(1.10 \pm 0.15) \times 10^{-6}$		
Pele Humana ( <i>in vivo</i> )	Glucose	40%	3.5		$(2.56 \pm 0.13) \times 10^{-6}$		

Considerando a composição interna do músculo, verificamos que as fibras musculares se encontram dispostas em planos sobrepostos no interior do tecido, sendo o espaço entre fibras preenchido por água. O índice de refração global para este tipo de tecidos é calculado como uma combinação de índices das fibras e da água presente. A equação seguinte representa tal combinação de valores em função das fracções de volume de cada constituinte <sup>(1, p:1-2)</sup>:

$$n_{natural} = f_{água} n_{água} + f_{sólido} n_{sólido} \quad \text{Equação 8}$$

Nesta equação, o parâmetro  $n_{natural}$  representa o valor do índice de refração global do tecido no seu estado natural,  $n_{água}$  representa o valor do índice de refração da água presente no espaço inter-fibras e  $n_{sólido}$  o valor do índice de refração dos constituintes sólidos do tecido <sup>(1, p:2)</sup>. Os parâmetros  $f_{água}$  e  $f_{sólido}$  representam respectivamente as fracções de volume da água e dos constituintes sólidos do tecido em estudo, sendo a sua soma igual ao volume total do tecido que é 100%:  $f_{água} + f_{sólido} = 1$  <sup>(1, p:1-2)</sup>. A equação 8 é a formulação matemática da Lei de Gladstone e Dale, que impõe que o valor do índice de refração global de um tecido biológico é uma média pesada dos valores dos índices de

refracção dos seus constituintes <sup>(1, p:1)</sup>. Por intermédio desta equação, podemos determinar por exemplo o valor do índice de refração dos constituintes sólidos do tecido, se soubermos que fracções de água e constituintes sólidos estão presentes e se conseguirmos medir o índice de refração global do tecido e da água que geralmente é simples de medir. No caso de não ser possível medir o índice de refração da água, este pode ser calculado pela seguinte relação <sup>(1, p:32)</sup>:

$$n_{\text{água}}(\lambda) = 1.31848 + \frac{6.662}{\lambda - 129.2} \cong 1.3199 + \frac{6878}{\lambda^2} - \frac{1.132 \times 10^9}{\lambda^4} + \frac{1.11 \times 10^{14}}{\lambda^6} \quad \text{Equação 9}$$

Pela equação anterior verificamos que o índice de refração varia em função do comprimento de onda da radiação. Sempre que uma medição é feita para o índice de refração da água, há uma radiação, com comprimento de onda bem definido, à qual se refere a medição. Este comprimento de onda é característico da instrumentação e do processo adoptado para a medição do índice de refração. Desta forma, sabendo que tipo de radiação óptica é utilizada para medir o índice de refração da água, podemos verificar o valor obtido substituindo o comprimento de onda da radiação óptica na equação 9.

Quando, um agente químico é difundido para o interior do tecido para proceder à criação de um efeito de transparência, o índice de refração do espaço inter-fibras torna-se uma função dependente do tempo imposta pela concentração do agente que se difunde para esta zona do tecido, e que assim também varia no tempo <sup>(1, p:16-17)</sup>. Esta concentração é calculada pela equação 7. Sabe-se que a fracção de volume do agente dentro do tecido, em qualquer instante de tempo, é proporcional à sua concentração <sup>(1, p:17)</sup>. Desta forma se utilizarmos a Lei de Gladstone e Dale (Equação 8), podemos escrever que para um determinado instante de tratamento:

$$n_{\text{tratado}} = f_{\text{agente}} n_{\text{agente}} + (1 - f_{\text{agente}}) n_{\text{natural}} \quad \text{Equação 10}$$

Na equação 10,  $1 - f_{\text{agente}}$  representa a fracção em volume do agente que se introduziu no tecido até o instante de tempo considerado. Com estas relações entre os índices de refração podemos determinar em qualquer instante de tempo de tratamento, que quantidade de agente osmótico se introduziu no interior do tecido por difusão. Tais cálculos e medições são importantes tanto para caracterização do tecido no seu estado natural, como para caracterizar o processo evolutivo de tratamento osmótico aplicado ao

tecido por administração do agente por qualquer processo. A equação 10 consiste numa aproximação simplista que permite determinar a fracção de agente que se introduziu para o interior do tecido até um determinado instante de tempo de tratamento. Na realidade, esta equação deve ser corrigida, para incluir o processo de desidratação do tecido que ocorre paralelamente à difusão do agente para o interior do tecido. Nessa situação, verifica-se que  $f_{\text{água}} + f_{\text{sólido}} + f_{\text{agente}} = 1$ . Apesar de esta ser a realidade, a equação 10 permite obter aproximações razoáveis em muitos casos. Sempre que o valor calculado pela equação 10 para a fracção de volume no interior do tecido após o tratamento seja um valor algo inferior a 1, então podemos testar este valor por comparação com a fracção de agente de constituintes sólidos no interior do tecido para verificar se a estimativa é boa. Os valores de massa poderão ajudar nesta análise conforme veremos.

Podemos considerar que a fracção de volume de água e de constituintes sólidos no interior de um tecido biológico podem ser relacionadas com a hidratação do tecido num dado instante. No estado natural, a hidratação do tecido é dada por <sup>(1, p:19-20)</sup>:

$$H = \frac{Massa_{\text{natural}} - Massa_{\text{seco}}}{Massa_{\text{seco}}} \quad \text{Equação 11}$$

Na equação 11, **H** representa a hidratação do tecido, **Massa<sub>natural</sub>** a massa medida no tecido natural e **Massa<sub>seco</sub>** a sua massa medida depois de completamente retirada a água do seu interior, isto é, a massa dos constituintes sólidos apenas.

Esta descrição não explica na totalidade o fenómeno de criação do efeito de transparência criado em tecidos biológicos por adição de agentes osmóticos. No entanto, a informação retirada de cálculos com estas equações pode ser complementada com outro tipo de informação, como variações de massa dos tecidos, variações no seu pH, imagens histológicas que apresentam cortes seccionais dos tecidos naturais e tratados e também evoluções temporais de espectros medidos nos tecidos por exemplo em transmissão. Todas estas informações se complementam para a caracterização do efeito de transparência que diversos agentes inócuos e hiper osmóticos permitem criar na matéria biológica. Na secção seguinte apresentaremos alguns agentes que apresentam características favoráveis à criação deste tipo de efeito em tecidos.

## 2.8 Agentes apropriados para criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos

São conhecidos actualmente diversos produtos com a capacidade de aumentar a transparência dos tecidos biológicos por difusão. Estes produtos apresentam características osmóticas de maior ou menor magnitude e características ópticas com grande interesse para a sua aplicação. Vários ensaios têm sido realizados nos mais variados tipos de tecidos biológicos. Estas experiências são realizadas maioritariamente em situações *in vitro*, estudando-se também situações *in vivo* em animais de laboratório. Nestes estudos, não se tem procurado apenas avaliar a grandeza dos efeitos criados nos materiais biológicos, mas também caracterizar o efeito em termos temporais, a reversibilidade do processo, a difusibilidade do agente para o interior do material, a sua eficácia no controlo das propriedades ópticas da matéria biológica e também a dependência entre o efeito e a concentração do agente utilizado.

Os resultados verificados são bons, para a grande maioria de agentes testados. A maioria destes produtos apresentam-se como soluções químicas que podem agrupar-se nas classes de açúcares, álcoois e soluções electrolíticas. Por outro lado, certos tipos de gel dermatológico, óleos, soluções de proteínas e soros foram também testados, tendo apresentado resultados favoráveis <sup>(1, p:34-45,148-155)</sup>. Na tabela seguinte apresentamos alguns agentes bio compatíveis que são actualmente reconhecidos na criação de efeitos temporários de transparência em tecidos biológicos. Nesta tabela figuram também os valores do peso molecular, o índice de refacção e a concentração respectiva de cada agente.

Tabela 3: Agentes osmóticos bio compatíveis utilizados no controlo das propriedades ópticas de tecidos biológicos. As referências RA e RT na tabela indicam que as medições do índice de refacção foram feitas com um refractómetro de Abbe (RA – Refractometer Abbe) com  $\lambda = 589 \text{ nm}$  e à temperatura ambiente (RT – Room Temperature) <sup>(1, p:34-45)</sup>

Agente	Peso molecular	Índice de refacção	Concentração	Comentários
Propileno Glicol (PPG)	76.1	1.4326	100%	Trata-se de um Álcool. É utilizado como solvente em veículos, na indústria farmacêutica, preparação de cosméticos e indústria alimentar. Mistura-se bem

				com água e muitos solventes orgânicos. Apresenta propriedades anti microbiais.
DMSO – Dimetil sulfóxido	78.1	1.4770 1.354 1.365 1.369 1.396 1.470	100% 10% 25% 30% 50% 100%	É uma substância natural derivada da polpa de Madeira. Apresenta capacidades únicas para penetrar no interior de tecidos vivos, para se associar à água, a proteínas, carboidratos, Ácidos nucleicos, substâncias iônicas e outros constituintes de sistemas vivos. Possui propriedades anti inflamatórias. Foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) como um preservativo de órgãos para transplantes e para tratamento de cistite intersticial. RA, RT.
Glicerina	92.1	1.4747   1.454 1.430	100%   88% (vol/vol) 71% (vol/vol)	Mistura-se bem em qualquer concentração em água, etanol, metanol, acetona. As soluções de glicerina e água apresentam um ponto de congelamento a temperaturas bastante baixas. É aplicado como suavizante da pele em cosméticos, na medicina e na indústria alimentar. É utilizado como produto base na preparação de uma solução oftálmica denominada “Ophthalgan” utilizada clinicamente para suavizar córneas inchadas. RA, RT.
Glicerina + DMSO (%)		1.455 1.460	20% 50%	RA, RT.
Anilina	93.1	1.5863	100%	Mistura-se bem com solventes orgânicos. É utilizado na produção de medicamentos e antioxidantes.
Glucose	180.2	1.360 1.363 1.378 1.391 1.415 1.460 1.390 1.398 1.442	0.18 g/ml 0.20 g/ml 0.30 g/ml 0.40 g/ml 0.54 g/ml 7M 40% 45% 72%	É utilizado em medicina para fins nutricionistas por aplicação intravenosa e também como um substituto dos componentes do sangue. RA, RT.
Sorbitol (designação inglesa)	182.2 Hidratação 200	1.375 1.420	25% 50%	Trata-se de um Carboidrato com sabor adocicado, utilizado por

				doentes com diabetes como substituto do açúcar e para nutrição diurética intravenosa. RA, RT.
Mannitol (designação inglesa)	182.2	1.357 1.374	0.16 g/ml 50%	Diurético utilizado para tratar edemas por injeção localizada. É utilizado em práticas de neurocirurgia como agente hiper osmóticos para reduzir a pressão intra craniano e inchaço de tecidos. Favorece o fluxo de sangue no cérebro. RA, RT.
Metileno de Iodo	267.8	1.7425	100%	É utilizado em análises de imersão. É um irritante da mucosa e apresenta um efeito narcótico.
Methyl salicylate (designação inglesa)		1.535-1.537	100%	Dissolve bem em álcool, éter, mas mal em água (0.07%), substância usada como componente em perfumes, substância usada como analgésico ou anti inflamatório em medicina.
Benzyl benzoate (Ascabiol) (designação inglesa)		1.568	100%	Líquido oleoso aromático utilizado em dermatologia como loção para aplicação tópica no tratamento de Sarna e Pediculose.
Trazograph-60 (designação inglesa)	~500	1.437	100%	Contrastante utilizado em radiologia. RA, RT.
Trazograph-76 (designação inglesa)	~500	1.460	100%	
Verografin-76 (designação inglesa)		1.485	100%	Contrastante utilizado em radiologia. RA, RT.
Hypaque-60 (designação inglesa)	~500	1.437	100%	Contrastante utilizado em radiologia.
Hypaque-76 (designação inglesa)	~500	1.460	100%	
IV Contrast (designação inglesa)		1.460	100%	Contrastante utilizado em radiologia.
Polietileno glicol (PEG)	150 – 40,000 1,550 6,000	1.459-1.467  1.370 1.405 1.368 1.394 1.403 1.469	 25% 50% 0.4 g/ml 0.6 g/ml 0.8 g/ml 1.0 g/ml	Líquido que com pesos moleculares até 400 se dissolve bem em muitos solventes orgânicos e com peso molecular até 600 dissolve bem em água. É utilizado na indústria farmacêutica e na preparação de cosméticos. RA, RT.
Polímeros baseados em PPG		1.47	100%	
Polímeros baseados em PEG		1.47	100%	
Dextrans (designação inglesa)	10,500 65,500	1.345(0.001) 1.353(0.002) 1.345(0.001) 1.353(0.002)	5 g/dl 10g/dl 5 g/dl 10g/dl	



	473,000	1.339(0.001) 1.341(0.001) 1.346(0.002) 1.52	0.5 g/dl 2 g/dl 5 g/dl 0.25 g/ml	sanguíneo.
Methyl cellulose (Celevac) (designação inglesa)	13,000-140,000	1.337	10%	Absorve bem a água. Utilizado em medicina para aplicação interna como medicamento purgativo. Usualmente não apresenta reacções. RA, RT.
Óleos: Parafina Coco Azeite Sésamo Girassol Aguarrás Algodão Papoila Amendoeira Faia Amendoim Rícino Linhaça Sândalo Cedro Cravo-da-índia Anis Canela		1.440 1.455 1.460-1.469 1.468 1.470 1.470 1.4730 1.463- 1.4742 1.475 1.475 1.4795 1.478-1.480 1.485 1.508 1.516 1.532-1.538 1.550-1.560 1.601		RA, RT.
Phosphate buffer saline (PBS) (designação inglesa)		1.332		pH 7.4
Clara de ovo + PBS		1.343		A clara de ovo foi adicionada a PBS, misturada e depois filtrou-se a mistura com filtros de dimensão 0.4 e 0.2 $\mu\text{m}$ para remover proteínas por dissolver;
Soro bovino de albumina (BSA) + PBS		1.345		Adicionou-se Soro bovino de albumina a PBS, misturando-se e depois filtrou-se a mistura com filtros de dimensão 0.4 e 0.2 $\mu\text{m}$ para remover proteínas por dissolver;
Clara de ovo		1.360		RA, RT.
5%-agar-agar		1.342		
Soluções aquosas de albumina		1.360–1.420 $\Delta n =$ 0.002–0.005		Fracção de 1/5 de soro de albumina bovina ou humana. Contém a massa total do soro de albumina e cerca de 3% de $\alpha$ -globulina e menos de 0.5% de $\beta$ -globulina. RA, RT
Gel de água-glicerina		1.360–1.420 $\Delta n =$ 0.002–0.005		Os kits de Gel são preparados por diluição de géis gelatinosos purificados, concentrados e

				livres de sais com turbidez de $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ em solução estéril de glicerina a 0.2% e NaCl a 0.5% com pH 7.0-7.2; Outras composições com 1%-glycerol, 1%-glycerol e 0.5 %-glucose, ou 10%-sacarose podem também ser utilizadas. RA, RT.
Gel de ultra sons		1.337	100%	Disponível em lojas da especialidade. RA, RT.
Gel de Aloe Vera		1.339	100%	Forma uma barreira protectora que ajuda a reter a humidade e promove a cura. É um humidificante não oleoso que proporciona a recuperação eficaz de queimaduras do Sol, e outras, assim como da irritação da pele, comichão e pele seca. Encontra-se disponível em farmácias. RA, RT.
Creme de limpeza da pele		1.403	100%	Composto sem substâncias oleosas para limpeza da pele. Deve ser utilizado juntamente com um humidificante. Disponível em farmácias. RA, RT.

Os dados apresentados na tabela 3 fazem parte de um conjunto de dados mais extenso publicado no livro *Optical Clearing of Tissues and Blood* <sup>(1)</sup>, e foram aqui reproduzidos com a devida autorização do autor.

Comparando entre os valores do índice de refração da tabela anterior e os que figuram para os tecidos biológicos da tabela 1, verificamos valores superiores para os índices de refração dos agentes químicos. Os valores inferiores verificados na tabela 1 devem-se, à forte presença dos fluidos intercelulares dentro dos tecidos. A difusão de agentes, como os apresentados nas tabelas 2 e 3, para o interior desses tecidos, irá aumentar o índice de refração nos espaços intersticiais para consequentemente reduzir o espalhamento da radiação que atravessa o tecido <sup>(1, p:12,26)</sup>.

### **Capítulo 3: Metodología**

### 3 Metodologia

Em face do actual estado da arte nesta área de investigação, avaliados os recursos materiais e instrumentais disponíveis para a realização do presente trabalho e também após a investigação sobre as dimensões e adaptabilidade às medições pretendidas de diferentes tipos de tecidos biológicos, optamos por utilizar no estudo óptico de resposta espectral tecidos musculares provenientes da parede abdominal de ratos utilizados em investigação clínica.

A escolha deste tipo de tecido biológico prende-se com a sua abundância num só animal, permitindo recolher quantidades suficientes com um mínimo de sacrifícios de animais. O tecido muscular é um tipo de tecido fibroso, em que as fibras musculares apresentam uma geometria aproximadamente cilíndrica e orientada dentro de planos sobrepostos dentro do tecido. Outros tipos de tecido fibroso foram já estudados sob a acção de agentes químicos osmóticos como o caso da esclerótica do olho que surge em algumas publicações <sup>(1, p:32)</sup> <sup>(50)</sup> e que anteriormente já mencionamos. Este tipo de tecidos apresenta grande turbidez devido a alguma absorção e principalmente devido a um elevado espalhamento, o que limita a profundidade de penetração óptica e a resolução espacial na aplicação de métodos ópticos <sup>(51)</sup>. Por ser um tecido que proporciona grande espalhamento da radiação que o atravessa, dada a disposição orientada das fibras musculares em planos perpendiculares à direcção de propagação da radiação óptica e por não se conhecerem trabalhos de investigação deste tipo realizados em músculo, reunimos uma grande motivação para a sua realização. Optamos por fazer atravessar a radiação óptica numa direcção perpendicular aos planos que contém as fibras por maior facilidade na recolha de amostras para o estudo. No entanto, poderá interessar estudar no futuro como é criado o efeito de transparência por passagem da radiação óptica paralelamente aos planos de localização das fibras.

Optamos por realizar o estudo em transmissão por facilidade de alinhamento dos componentes ópticos a utilizar e também porque a realização do estudo *in vitro* assim o torna possível. Assim, realizamos vários estudos preliminares que pretendiam servir para a eliminação de dificuldades experimentais, otimizar a técnica de estudo e o consequente estabelecimento de uma metodologia de trabalho a adoptar. Tais ensaios foram sendo feitos sucessivamente experimentando técnicas e instrumentação de diversas especialidades, sob a indicação dos orientadores e as sugestões do consultor deste trabalho de investigação. Depois de eliminadas certas dificuldades experimentais e

de feito o devido ajuste da experimentação aos recursos disponíveis, pudemos elaborar a metodologia a adoptar em cada um dos estudos a realizar, que aqui descrevemos.

### **3.1 Construção do suporte experimental**

Como vimos no estado da arte, existem diversos métodos para controlar as propriedades ópticas dos tecidos biológicos. Em face desta realidade e como pretendemos controlar as propriedades ópticas dos tecidos a estudar apenas pela imersão em soluções osmóticas, devemos preparar um suporte que limite ao máximo variações de temperatura e forças de tensão sobre os tecidos, para que, caso estes fenómenos ocorram possam os seus efeitos ser desprezados em face do fenómeno originado pela imersão. Desta forma, o suporte dos tecidos deve manter-se afastado de fontes consideráveis de calor e manter o tecido em estudo numa posição arejada, impedindo que durante o estudo, o tecido não sofra variações de temperatura. Por outro lado, a forma de suporte dos tecidos não deve permitir a existência de forças ou tensões sobre os tecidos em estudo, que como vimos influenciam também as propriedades ópticas dos tecidos. Dado que pretendemos controlar a radiação que é transmitida nos tecidos biológicos, torna-se conveniente garantir que os tecidos a estudar se encontram completamente isolados opticamente do exterior impossibilitando a entrada de radiação óptica indesejável na área de experimentação.

Considerando estes aspectos criamos um sistema que funciona como uma caixa negra, onde se faz atravessar a radiação óptica pelos tecidos biológicos, permitindo a medição em transmissão. Este sistema é constituído por duas peças que encaixam perfeitamente uma na outra. Depois de encaixadas as duas peças, a zona de experimentação fica quase completamente isolada do exterior. No entanto existem duas aberturas em planos perpendiculares à direcção de propagação da radiação óptica que atravessa os tecidos para manter o tecido arejado no local de medição. Tais aberturas encontram-se bastante distantes da zona onde o feixe que atravessa os tecidos se propaga, para evitar a inserção de radiação exterior e a sua abertura é reduzida. Começamos por fazer um desenho para as duas peças deste suporte em plástico preto que irá sustentar os tecidos a estudar e suportar também os cabos de fibra óptica de iluminação e recolha da radiação óptica transmitida a entregar ao espectrofotómetro. Ambas as peças são resistentes mecanicamente e estáveis. As dimensões e configuração geométrica de ambas as peças do suporte mecânico encontram-se representadas nas figuras 1 e 2. Com o desenho do

suporte, recorreremos a um torneiro mecânico para o construir. O material escolhido foi o plástico preto e a partir de dois blocos deste material, foi possível tornear as formas desenhadas com as dimensões pretendidas.

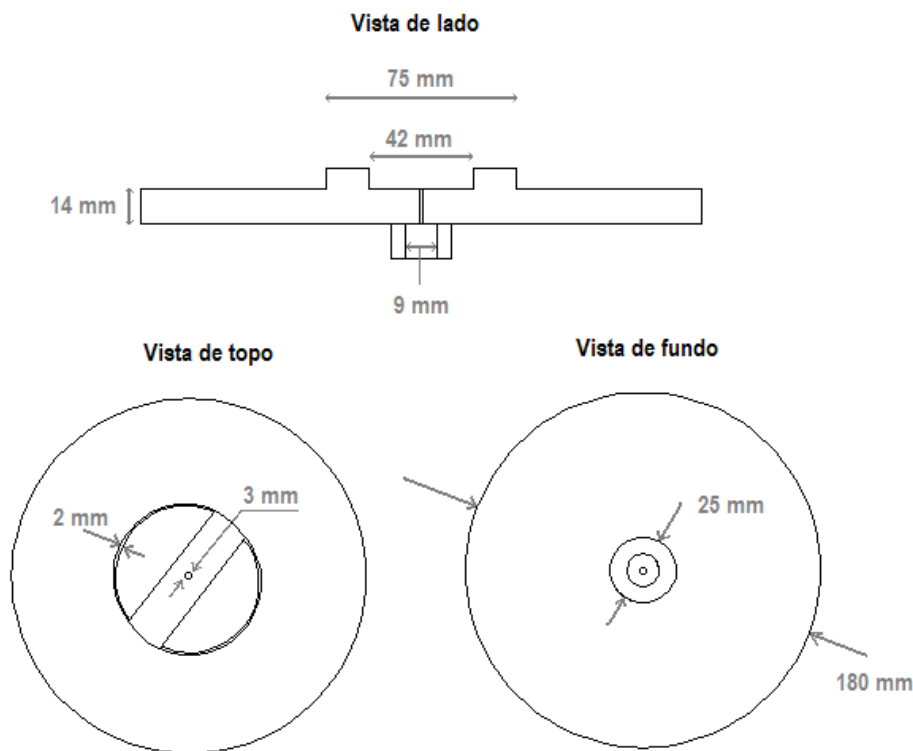


Figura 1: Suporte dos tecidos e da fibra de detecção

Os tecidos são colocados na zona central, sobrepondo o cabo de fibra de detecção que se encontra inserida no orifício de 3 mm de diâmetro (ver figura 1 – vista de topo). Este cabo encontra-se fixo ao suporte por intermédio de um parafuso (não representado na figura) para que seja mantida a estabilidade óptica do sistema experimental durante os estudos. Na zona de colocação dos tecidos, encontra-se um batente (não representado na figura anterior) também em plástico preto com 1 mm de altura, para impedir que o tecido fique encostado na extremidade do cabo de fibra óptica de recolha da radiação transmitida. Desta forma, quando da aplicação dos agentes aos tecidos em estudo, cada agente pode espalhar-se em volta dos tecidos para proporcionar uma imersão perfeita dos tecidos. Para isolar opticamente a zona experimental e para suportar o cabo de fibra de iluminação, construímos a outra peça no mesmo material que encaixa perfeitamente no interior do círculo com diâmetro externo de 75 mm (ver figura 1 – vista de lado). Esta peça superior de suporte da fibra de iluminação encontra-se representada na figura seguinte, onde figuram as dimensões relevantes. Note-se que as figuras 1 e 2 não se

encontram representadas à mesma escala para melhor percepção da configuração e dimensões da peça superior.

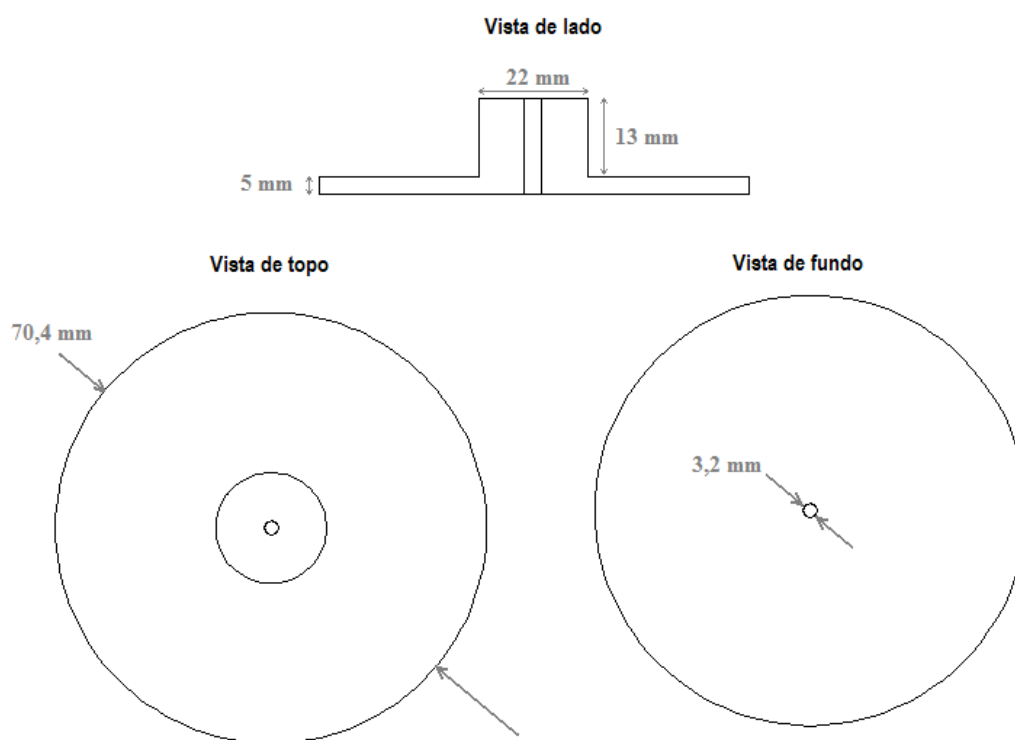


Figura 2: suporte superior para fibra de iluminação

Com esta montagem experimental fechada, o sistema encontra-se isolado opticamente, permitindo eliminar erros nos espectros medidos. O cabo de fibra óptica proveniente da fonte de iluminação é inserido no interior do orifício de diâmetro 3,2 mm (ver figura 2 – vista de lado), para injectar a radiação óptica bem próximo do tecido. Este cabo é fixo por intermédio de um parafuso (não representado na figura 2) à peça superior do suporte experimental, para manter a estabilidade óptica do sistema experimental durante os estudos.

### 3.2 Software de aquisição espectral

Para a aquisição dos espectros de transmitância óptica, iremos utilizar o software do fabricante do espectrofotómetro – Ocean Optics<sup>TM</sup>. Este software permite ajustar parâmetros para otimizar o espectrofotómetro que controla, e também ajustar grandezas características de cada medição como por exemplo o tempo de integração para a aquisição espectral. Este software é designado pelo fabricante por *OOIBase*

*Versão 1.52.00.* Uma descrição das funcionalidades deste software e dos procedimentos necessários em cada estudo experimental encontra-se no anexo A.

Vamos utilizar este software para medir os espectros de transmissão dos tecidos ao longo do tempo durante o tratamento osmótico com os diferentes agentes que pretendemos estudar. A transmissão de radiação óptica medida através de um material é a percentagem de energia luminosa que atravessa o material relativamente à quantidade de energia luminosa que atravessa a mesma montagem experimental sem o material que se pretende estudar <sup>(52)</sup>. Esta quantidade de energia luminosa medida na montagem experimental sem o material é chamada de referência e deve ser medida em todos os estudos experimentais realizados <sup>(52)</sup>. A transmissão é representada em percentagem relativamente à referência medida através da montagem experimental sem qualquer amostra entre as fibras de emissão e detecção. Tal como descrito no anexo A, iniciamos o processo de medição, em cada estudo experimental, registando os espectros de referência no modo de operação *Scope*. Comuta-se depois o modo de aquisição de *Scope* para *Transmissão*, visto ser este tipo de espectros que pretendemos medir. Estes processos e a forma como é calculado o espectro de transmitância por parte do software encontram-se descritos no anexo A.

Uma vez no modo de aquisição em transmissão, começamos por medir o espectro de transmitância natural do tecido. Este espectro é medido antes da imersão do tecido no agente e serve de referência temporal para o efeito de transparência a criar. Posteriormente, o tecido em estudo é imerso no agente osmótico e passamos a medir os espectros de transmitância ao longo do tempo com o software. Este processo de medição termina após termos detectado visualmente que a transmitância espectral entrou no regime de saturação <sup>(1, p:50)</sup>.

### **3.3 População de animais para estudo**

Como referimos anteriormente, pretendemos realizar o estudo experimental em amostras de tecido muscular da parede abdominal de ratos. Estes animais são da espécie *Wistar Han* e é de prática comum a sua utilização na investigação clínica.





Figura 3: Rato utilizado na investigação – Espécie *Wistar Han*

Dado que em cada estudo iremos utilizar uma quantidade de amostras na ordem de 10 ou mais, e considerando que este número de amostras com as dimensões pretendidas (aproximadamente 15 mm por 15 mm por 0.5 mm de espessura) se consegue obter de um animal, iremos necessitar de 1 animal por estudo. Iremos realizar 6 estudos experimentais para medir opticamente o efeito de transparência criado pelos diversos agentes. Por outro lado, pretendemos realizar 3 a 4 estudos adicionais para medir apenas o índice de refração dos tecidos naturais e depois do tratamento osmótico, reservando alguns animais para eventuais estudos que sejam necessários realizar para repetir medições. Desta forma iremos adquirir uma população de 14 animais, todos machos e com uma idade aproximadamente de 3 meses, que ficarão armazenados no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Desta população, metade será adquirida com uma massa por animal de 250 gramas para utilização imediata, apresentando os restantes, uma massa por animal de 200 gramas para que possam aumentar de peso durante a realização dos primeiros estudos, ficando com valores de massa semelhantes aos que serão utilizados inicialmente quando forem sacrificados. A aquisição dos animais foi feita aos Laboratórios Charles River em Barcelona, Espanha.

### 3.4 Tipo de tecidos

O Tecido muscular da parede abdominal do rato apresenta certas características muito particulares. Em primeiro lugar trata-se de um músculo do tipo estriado (ou musculo do esqueleto) que é um tecido mole <sup>(1, p:1)</sup>. A sua constituição interna é feita à base de fibras musculares e de liquido intersticial que geralmente apresenta uma concentração de água em 100% <sup>(1, p:1,12) (39)</sup>. As fibras que se encontram no interior do tecido muscular dispõem-se geralmente em planos subjacentes mas com direcções longitudinais nem sempre paralelas entre si dentro do mesmo plano. A secção transversal destas fibras

pode também variar de fibra para fibra, embora a ordem de grandeza verificada para as diversas fibras dentro de um mesmo tecido seja semelhante <sup>(1, p.13)</sup>. Estas fibras constituem uma estrutura complexa de outras mais pequenas. Sabe-se que as fibras são combinações entrelaçadas de outras estruturas de menor dimensão chamadas fibrilhas musculares <sup>(3)</sup>. Por sua vez, estas fibrilhas são compostas por diversas ligações lineares de proteínas chamadas Actina e Miosina <sup>(3)</sup>. Com esta configuração de fibras musculares e água no espaço inter-fibras, torna-se evidente que grande parte da radiação óptica que se faz introduzir numa amostra plana deste tipo de tecido irá sofrer espalhamento no interior do tecido devido às diferenças localizadas do índice de refração. Trata-se pois de um bom tipo de tecido para submeter ao estudo que pretendemos realizar, pois iremos certamente partir de uma transmitância espectral óptica diminuta devido ao espalhamento originado pela sua constituição interna. Com a imersão dos tecidos nos agentes osmóticos esperamos poder verificar aumentos significativos no espectro de transmissão dos tecidos ao longo do tempo de tratamento osmótico.

### **3.5 Sacrificio e recolha de tecidos**

O sacrificio dos animais, recolha e preparação dos tecidos para estudo será feito no Instituto de Histologia e Embriologia Professor Abel Salazar localizado na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Para cada animal a utilizar num estudo, é necessário proceder inicialmente com o abate para posterior recolha dos tecidos a estudar. Assim, o animal é injectado com um soro para atingir um estado anestésico e posteriormente é abatido pelo método de decapitação com guilhotina. Este método é muito utilizado, uma vez que permite a evacuação do sangue das cavidades abdominal e torácica, permitindo assim a dissecação de forma mais limpa e eficaz.

Para recolhermos o músculo da parede abdominal do animal procedemos com a dissecação, começando por efectuar uma incisão na parte inferior frontal do chamado “casaco”, recorrendo-nos de uma tesoura e pinça cirúrgicos. Com a tesoura, é feita uma abertura desde a zona da bexiga até à parte superior da cavidade torácica, para que toda a parte frontal fique exposta, conforme podemos ver na figura seguinte.



Figura 4: Músculo da parede abdominal exposto

Nesta altura, secciona-se com um bisturi e tesoura cirúrgicos o músculo da parede abdominal, retirando-o do animal. Para as idades escolhidas dos animais, o músculo da parede abdominal apresenta uma espessura máxima da ordem de 2 mm a 2.5 mm. Com todo o músculo retirado do animal, podemos preparar as amostras para o estudo a realizar, sendo os restantes órgãos e sistemas do animal aproveitados para outros projectos de investigação a decorrer no Instituto de Histologia.

Para preparar o músculo, começamos por retalhá-lo em blocos com forma quadrada e áreas superficiais de aproximadamente 225 mm<sup>2</sup> (quadrados de 15 mm por 15 mm). Os blocos são retirados das áreas laterais esquerda e direita do abdómen. Escolhemos as regiões centrais esquerda e direita do músculo para evitar recolher as amostras junto às zonas de fixação do músculo ao esqueleto e também para garantir amostras com maior espesura. Desta forma garantimos uma distribuição mais uniforme das fibras musculares no interior das amostras a estudar e também uma espessura mais uniforme nos blocos colhidos. Estes blocos são inseridos na câmara refrigerada de um criostato para congelarem a -20°C por imersão em água. A água é utilizada em detrimento do produto habitualmente utilizado neste processo, uma vez que na sua constituição química existe uma percentagem considerável de Polietileno Glicol, cujas propriedades osmóticas e capacidade de criação de efeitos de transparência são conhecidas actualmente <sup>(45)</sup>. Uma vez atingida a temperatura mencionada dentro da câmara do criostato, o bloco de tecido e seu suporte mecânico são colocados na posição de corte, para procedermos à recolha das amostras com 0.5 mm de espessura.

Este processo de congelamento para conseguirmos o corte dos tecidos bloqueia a actividade no interior das células dos tecidos. Desta forma, conseguimos amostras de tecido onde não ocorrem quaisquer processos dinâmicos característicos de qualquer tecido numa situação *in vivo*. Esta é a realidade que estará presente na nossa montagem experimental. Será interessante, após concluídos os estudos experimentais, verificar a viabilidade de realizar medições numa situação *in vivo* para avaliar os efeitos de transparência criados e comparar com os resultados que iremos obter no presente trabalho. Alguns estudos foram já apresentados, onde se refere o tempo de vida das células para o músculo liso dos ratos. Nestes estudos <sup>(53)</sup>, verifica-se a diminuição dos níveis de ATP e de Glicogénio, assim como o aumento de Ácido Lácteo entre 1 hora a 2 horas após o sacrifício dos animais estudados. A diminuição dos níveis destas substâncias indica o término dos processos dinâmicos que ocorrem nas células e por conseguinte a sua morte. Devido ao congelamento necessário para cortar as amostras no criostato, iremos submeter ao estudo experimental tecidos no estado *ex vivo*. No entanto para futuros desenvolvimentos em que pretendamos estudar a difusão osmótica de agentes em tecidos recolhidos que não necessitem de ser cortados, teremos que considerar este período de tempo que as células mantêm os seus processos dinâmicos.

Para obtermos as amostras, começando por cortar com o criostato a camada superficial de gelo que recobre o tecido e também uma primeira secção deste para garantir uma face plana no bloco de músculo, para as amostras seguintes. Cortamos tantas amostras quantas possível deste bloco (e dos restantes), com a espessura de 0.5 mm. Em geral podemos obter de cada bloco 2 a 3 amostras. Depois de cortarmos o número de amostras necessário ao estudo, passamos a catalogar cada uma para posterior referência ao longo do trabalho.

Os estudos experimentais que pretendemos realizar são de dois tipos distintos. O primeiro consiste em avaliar a dependência entre o efeito de transparência criado com a concentração de agente aplicado, considerando-se o Etileno Glicol e a Glicerina. O segundo estudo consiste em analisar e caracterizar os efeitos de transparência criados por 5 agentes distintos. Neste segundo estudo iremos utilizar todos os agentes anteriormente referidos.

Desta forma, o número de amostras a estudar em cada caso irá variar. Assim, para o primeiro tipo de estudo experimental, onde iremos utilizar 3 soluções osmóticas com diferentes concentrações de Glicerina e outras 3 com as mesmas concentrações de Etileno Glicol necessitaremos de 7 amostras de tecido (1 tecido não receberá tratamento

osmótico para servir de referência na análise histológica). As concentrações escolhidas para as seis soluções osmóticas (3 de Etileno Glicol e 3 de Glicerina) são de 50%, 75% e 87%. O tecido de referência permanece imerso em soro fisiológico durante o estudo dos restantes tecidos para não perder a sua hidratação. Os agentes serão atribuídos aos demais tecidos conforme se descreve na tabela seguinte:

Tabela 4: Atribuição dos agentes aos tecidos para o estudo das concentrações

<b>Tecidos</b>	<b>Agente</b>	$\frac{\text{Volume de Agente}}{\text{Volume de Tecido}}$
O1	Soro fisiológico	2
O2	Glicerina 50%	2
O3	Glicerina 75%	2
O4	Glicerina 87%	2
O5	Etileno Glicol 50%	2
O6	Etileno Glicol 75%	2
O7	Etileno Glicol 87%	2

Para o estudo a realizar com vários agentes diferentes iremos considerar dois grupos de tecidos: um para controlo histológico e outro a submeter ao estudo óptico. Os tecidos destes dois grupos serão posteriormente comparados a nível histológico. As 12 amostras de tecidos a utilizar neste estudo serão separadas em dois grupos conforme se descreve na tabela seguinte:

Tabela 5: Grupos e designações das amostras a utilizar no estudo

<b>Grupo H – Controlo Histológico</b>						
<b>Tecido</b>	H1	H2	H3	H4	H5	H6
<b>Grupo O – Estudo Óptico</b>						
<b>Tecido</b>	O1	O2	O3	O4	O5	O6

Todos os tecidos serão tratados quimicamente com os agentes químicos osmóticos, mas enquanto que os do grupo de estudo óptico são atravessados por radiação óptica, os do grupo de controlo histológico não serão. Uma vez feita a divisão das amostras e sua

catalogação, podemos avaliar e registar parâmetros de cada uma que irão certamente variar com a imersão nas soluções osmóticas. O registo destes valores servirá no final de cada estudo para calcular as variações ocorridas por comparação entre os valores de cada um dos parâmetros medidos antes e depois da acção por imersão dos agentes químicos. Os tecidos apresentados na tabela anterior serão imersos em agentes químicos de acordo com o estabelecido na tabela seguinte:

Tabela 6: Atribuição dos agentes aos tecidos

<b>Tecidos</b>	<b>Agente</b>	<i><math>\frac{\text{Volume de Agente}}{\text{Volume de Tecido}}</math></i>
H1 e O1	Soro fisiológico	2
H2 e O2	Glicerina 50%	2
H3 e O3	Glucose 40%	2
H4 e O4	Etileno Glicol 99%	2
H5 e O5	Propileno Glicol	2
H6 e O6	Solução de Etanol, Glicerina e Água Destilada nas proporções 1:1:2	2

Este processo de recolha de amostras e atribuição dos agentes para a realização do estudo experimental com os diferentes agentes osmóticos será feito em 5 estudos independentes para podermos calcular efeitos médios de transparência e correspondentes desvios experimentais para cada um dos agentes escolhidos e consequente comparação de efeitos entre agentes.

### 3.6 Registo de parâmetros iniciais dos tecidos

Para cada amostra de tecido a utilizar nos diversos estudos experimentais, começamos por medir a sua massa com uma balança de precisão. Tal balança apresenta uma precisão nas milésimas de grama. Estes valores iniciais representam a massa dos tecidos no estado natural e serão posteriormente comparados com os correspondentes que serão medidos após o tratamento osmótico.

Para o caso dos 5 estudos com diferentes agentes, são administrados aos tecidos do grupo H os agentes químicos de acordo com a tabela 6 para dar início ao tratamento

osmótico. Os tecidos do grupo O são todos imersos em soro fisiológico para manterem a sua hidratação durante o transporte desde o Instituto de Histologia e Embriologia Professor Abel Salazar até ao Serviço de Otorrinolaringologia, onde se realiza o estudo óptico. Uma vez no local de estudo óptico, é avaliado para cada amostra de tecido o seu valor inicial de pH. Estes valores são registados para futura comparação com os valores finais e a sua medição é feita depois de retirada a água exterior aos tecidos com um papel absorvente. Considera-se este valor de pH, como o pH natural dos tecidos. A sonda de medição do pH é uma sonda de contacto, o que a torna adequada para a realização de medições nos tecidos estudados, pois estes apresentam uma área superficial plana onde pode ser estabelecido o contacto com a sonda. O medidor de pH apresenta uma precisão de medição nas centésimas de pH e para cada medição efectuada é também apresentado o valor da temperatura a que é feita a medição com precisão às décimas de grau Celsius. Embora a temperatura possa variar de dia para dia no local de estudo, a sua variação durante o tempo de realização de um mesmo estudo verificou-se ser no máximo de 2 °C. Idealmente seria preferível realizar todos os estudos experimentais à temperatura fisiológica de forma a simular o processo tal como aconteceria no caso de um músculo *in vivo* no interior do corpo humano ou num animal. Os valores registados nos diversos dias de estudo encontravam-se sempre acima de 18°C, mas nunca ultrapassaram os 26°C. Verificamos assim uma variação máxima de temperatura de 8 °C entre dias de realização dos estudos experimentais, imposta pela variação da temperatura ambiente. Devido a esta diferença de temperaturas verificada entre os diferentes dias, poderão ocorrer alterações nas propriedades ópticas dos tecidos e por conseguinte na sua transmitância natural. Não obstante, a variação de temperatura durante um mesmo dia de estudo experimental é no máximo de 2 °C. Assim, as eventuais variações que possam ocorrer na transmitância do tecido devido à variação de temperatura serão insignificantes quando comparadas com as alterações criadas na transmitância pelo processo de imersão no agente. O cálculo dos efeitos médios de transparência criados por cada agente nos tecidos poderá eliminar eventuais diferenças criadas pela variação de temperatura entre dias diferentes de estudo experimental.

Relativamente à espessura de cada tecido a estudar, estima-se o valor de 0.5 mm calibrado no criostato. No entanto, como o tecido sofre pequenas variações de volume nos processos de congelamento e descongelamento antes e após o corte com o criostato, então iremos confirmar este parâmetro posteriormente por análise da secção transversal dos tecidos considerados naturais após obtenção de fotografias em microscópio. Note-se

que o congelamento de tecidos provoca alterações na massa e no volume das amostras conforme foi já descrito na literatura <sup>(1, p:68)</sup>. Iremos descrever o processo de medição da espessura por análise fotográfica numa secção mais à frente. Esta descrição é também adoptada para o estudo com diferentes concentrações de Glicerina e Etileno Glicol, embora o número de tecidos a estudar seja de apenas 7, conforme podemos verificar na tabela 4.

Foram também estudadas as variações que ocorrem no valor do índice de refração durante o tratamento químico dos tecidos. Para a medição deste parâmetro utilizamos um Refractómetro de Abbe. Este equipamento encontra-se descrito no Anexo B do presente trabalho. Dado que nos foi possibilitado utilizar (em datas pré-definidas) o Refractómetro para a realização de tais medições, optamos por efectuar dois estudos em dias independentes. Antes da realização destes estudos determinamos a espessura ideal dos tecidos a submeter ao estudo com o Refractómetro de Abbe. Sabemos que o Refractómetro de Abbe é um equipamento capaz de medir o índice de refração em amostras líquidas transparentes e também em amostras sólidas translúcidas. Um tecido biológico é tudo menos translúcido. No entanto, a turbidez natural dos tecidos biológicos aumenta com a sua espessura. Devido a este facto, recolhemos algumas amostras de tecido com espessuras diferentes para avaliar com o refractómetro qual a adequada para a realização das medições que pretendemos. Este ensaio de espessuras feito num estudo preliminar. As espessuras escolhidas foram de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.45 e 0.5 mm. Para aumentar o contraste neste tipo de medição, utilizamos um laser semiconductor vermelho para iluminar as amostras entre os prismas do refractómetro, de acordo com as sugestões do Consultor deste trabalho. A iluminação da amostra com um laser semiconductor com emissão no vermelho ( $\lambda \sim 633$  nm) proporciona maior contraste na avaliação do índice de refração, embora os valores medidos sejam referenciados a 589 nm <sup>(1, p:34)</sup>. As amostras de menor espessura são muito difíceis de manusear sem causa de danos. Assim testamos as amostras de maior espessura, descendo progressivamente neste parâmetro até conseguirmos um valor que permita medições com a precisão desejada. Para as amostras de 0.5 e 0.45 mm, verificamos não poder alinhar com precisão a linha divisória das zonas de projecção da radiação óptica e de sombra (veja-se anexo B) com o retículo no visor do refractómetro. Isto deve-se à falta de contraste causada pela grande espessura das amostras. Para a amostra de 0.4 conseguimos realizar o alinhamento com precisão. Nesta situação observamos o valor



do índice de refração na escala do refractómetro que indicava 1.398. Desta forma, iremos adoptar nos estudos a realizar com o refractómetro espessuras de 0.4 mm.

O primeiro estudo será feito com 6 tecidos. Um tecido será utilizado para registar os seus valores de índice de refração e de massa durante um processo de desidratação com o auxílio de um secador de cabelo. Os restantes serão utilizados para medir o índice de refração no estado natural para cálculo de um valor médio, uma vez que a constituição interna dos tecidos pode variar de amostra para amostra. Com os valores obtidos no tecido em desidratação, pretendemos calcular o valor de índice de refração dos constituintes sólidos dos tecidos e também os valores de fracções de água e de componentes sólidos presentes no estado natural dos tecidos. O cálculo destes valores será feito por resolução da equação 8 nas situações de desidratação onde são medidos os valores de massa e de índice de refração. Os valores da massa em cada instante de desidratação serão utilizados para determinar os valores de fracção em volume da água em cada situação de desidratação que serão utilizados na equação 8. Os valores de fracção em volume de água podem ser determinado a partir da massa uma vez que a densidade da água é 1 g/ml. A determinação desses valores de fracções de volume da água para diferentes estados de desidratação será realizada utilizando a equação 11 com uma pequena correcção. O segundo estudo refere-se à medição dos tecidos tratados com o refractómetro de Abbe e encontra-se descrito na secção 3.10.

### **3.7 Caracterização dos agentes osmóticos a utilizar**

Assim como os tecidos biológicos são caracterizados previamente ao estudo óptico, também os agentes osmóticos o devem ser de forma a podermos melhor interpretar as variações ocorridas nos tecidos em termos dos parâmetros ópticos e químicos. Iremos utilizar cinco agentes osmóticos diferentes e em variadas concentrações em solução aquosa para a realização de estudos dos efeitos de transparência criado nos tecidos. Cada um destes agentes químicos osmóticos foi avaliado em termos de pH e de índice de refração. Serão também apresentadas outras características como a constituição molecular e concentração respectiva conforme a disponibilidade de tais características por parte dos fornecedores.

Os agentes osmóticos escolhidos para a realização dos diferentes estudos experimentais foram preparados em solução. Utilizamos nos primeiros 5 estudos experimentais 5 agentes osmóticos: a Glicerina diluída em solução aquosa com concentração de 50%; a

Glucose diluída em solução aquosa com concentração de 40%; o Etileno glicol diluído em solução aquosa com concentração de 99%; o Propileno glicol puro e uma outra solução que é uma mistura de Etanol com Glicerina e Água destilada nas proporções 1:1:2. Em todos os casos estamos perante soluções químicas que se enquadram ou muito se aproximam dos compostos designados por açúcares ou álcoois <sup>(1, p.11x)</sup>. Para estes tipos de químicos verificamos uma constituição molecular com a presença de apenas átomos de carbono, hidrogénio e oxigénio que apresentam configurações e ligações químicas distintas entre si <sup>(2)</sup>.

No outro estudo de caracterização e comparação dos efeitos de transparência criados por soluções de Glicerina e Etileno Glicol utilizamos três soluções com concentrações diferentes para cada um destes agentes. Essas concentrações são, como já referimos de 50%, 75% e 87%. Para estes agentes iremos também apresentar o valor de pH medido.

### **3.8 Tecidos de controlo da actividade osmótica de soluções**

Como anteriormente referimos, os cinco estudos que iremos realizar para caracterizar e comparar os efeitos de transparência criados nos tecidos por 5 soluções osmóticas distintas, terão dois grupos de tecidos: os que servirão de controlo histológico e os que serão submetidos ao estudo óptico.

Os tecidos que se inserem no grupo de controlo histológico (tecidos designados pela letra H) são tratados com as soluções químicas acima descritas conforme apresentado na tabela 6. A diferença entre os tecidos deste grupo e os que se inserem no grupo do estudo óptico (tecidos designados pela letra O) é que os tecidos H não são atravessados pela radiação, para servirem de referência na avaliação dos efeitos causados no seu interior. Pretendemos com esta análise comparativa dos parâmetros estudados nas fotografias obtidas em microscópio dos cortes transversais, verificar se a radiação óptica produz algum efeito nos tecidos que seja perceptível. O processo de imersão dos tecidos H leva 30 minutos (tempo verificado ser suficiente para todos os agentes escolhidos nos estudos preliminares e para a espessura estimada de 0.5 mm dos tecidos), ficando depois os tecidos disponíveis para o pós-processamento histológico que leva à obtenção das imagens microscópicas para análise. Estas imagens serão não só comparadas entre si, mas também com as obtidas dos tecidos do grupo de estudo óptico para identificar eventuais diferenças.

### 3.9 Estudo espectral óptico em transmissão

Para realizarmos qualquer estudo óptico em transmissão com os tecidos imersos nos agentes osmóticos devemos começar por ajustar a instrumentação óptica e o software de aquisição às condições experimentais que dispomos. O processo inicial de aquisição dos espectros de referência encontra-se descrito no anexo A. Uma vez seleccionado o modo de aquisição em transmissão podemos colocar o tecido no local de medição para dar início ao estudo óptico.

Como vimos no Estado da Arte, existem diferentes métodos capazes de alterar as propriedades ópticas dos tecidos biológicos e por conseguinte a sua transmitância por redução do espalhamento e absorção característicos. Durante o trabalho preocupamo-nos em manter constante a temperatura dentro do que nos é possível controlar, assim como a colocação das amostras na montagem experimental foi feita de forma cuidadosa para que não fiquem sujeitas a quaisquer forças ou tensões, para que o efeito criado seja apenas consequência da aplicação dos agentes osmóticos que pretendemos estudar. Os tecidos a estudar foram colocados sobre o suporte mecânico experimental e em posição horizontal. A única força a que ficam sujeitos é a da força da gravidade, que se mantém constante ao longo de todo o estudo para o mesmo tecido. Desta forma, quaisquer variações que possam ocorrer nas dimensões do tecido em estudo, terão origem na adição do agente osmótico e não em forças externas aplicadas. Nenhum outro processo externo foi aplicado aos tecidos durante os estudos experimentais realizados, que possa influenciar as variações detectadas opticamente.

Cada tecido a ser submetido ao estudo óptico de transmissão é colocado sobre a zona central do suporte mecânico, ficando as fibras ópticas de iluminação e recolha da radiação transmitida perfeitamente alinhadas e uma de cada lado do tecido. Entre as extremidades das fibras e o tecido, existem pequenos espaços para que os agentes osmóticos administrados possam colocar-se em volta do tecido provocando a imersão. Esta montagem encontra-se representada na figura 5:

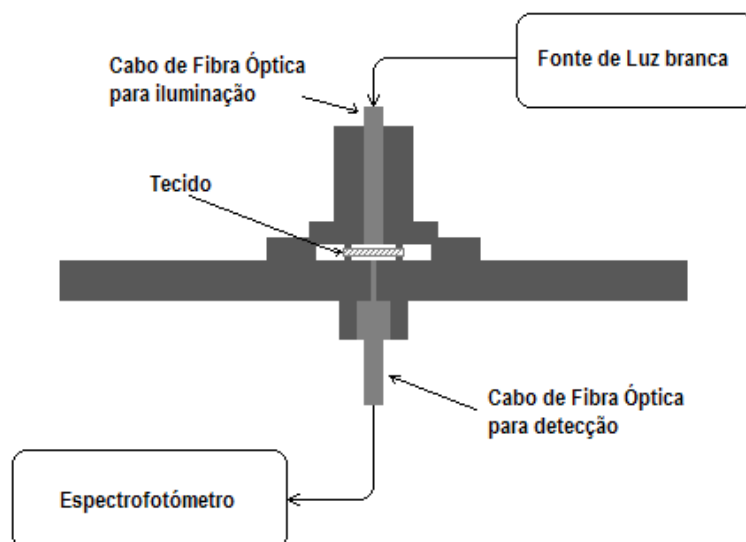


Figura 5: Montagem experimental de medição

O processo de medição em transmissão que iremos utilizar é idêntico para todos os tecidos a estudar, quer para o estudo de caracterização do efeito de transparência criado por diferentes agentes, quer para o estudo da dependência entre o efeito criado e a concentração de glicerina e de etileno glicol em solução aquosa.

Assim para todos os tecidos que pretendemos estudar em transmissão óptica, começamos por medir a transmitância natural característica do tecido. Para tal, secamos o tecido com papel absorvente, de forma a retirar qualquer resíduo de água ou soro fisiológico que possa encontrar-se em volta do tecido. Tal é feito para que a contribuição de água no espectro a medir seja apenas da água que se encontra naturalmente no interior do tecido. O tecido é então colocado na montagem experimental, como descrito na figura 5, ficando fixo pelos pequenos batentes colocados nos suportes mecânicos superior e inferior. As fibras de iluminação e de recolha da radiação transmitida são colocadas na sua posição na montagem experimental, como apresentado na figura 5.

Depois de colocadas em posição, as fibras são fixas aos suportes mecânicos por pequenos parafusos de forma a impedir que se desloquem da sua posição de medição. Estamos nesta altura em condições de efectuar a medição da transmitância espectral óptica natural do tecido. Como o espectro é apresentado pelo software em tempo real, podemos verificar se ocorrem alterações significativas no tempo. Tal não se verifica para tecidos naturais. Registamos e guardamos o espectro natural do tecido com o software.

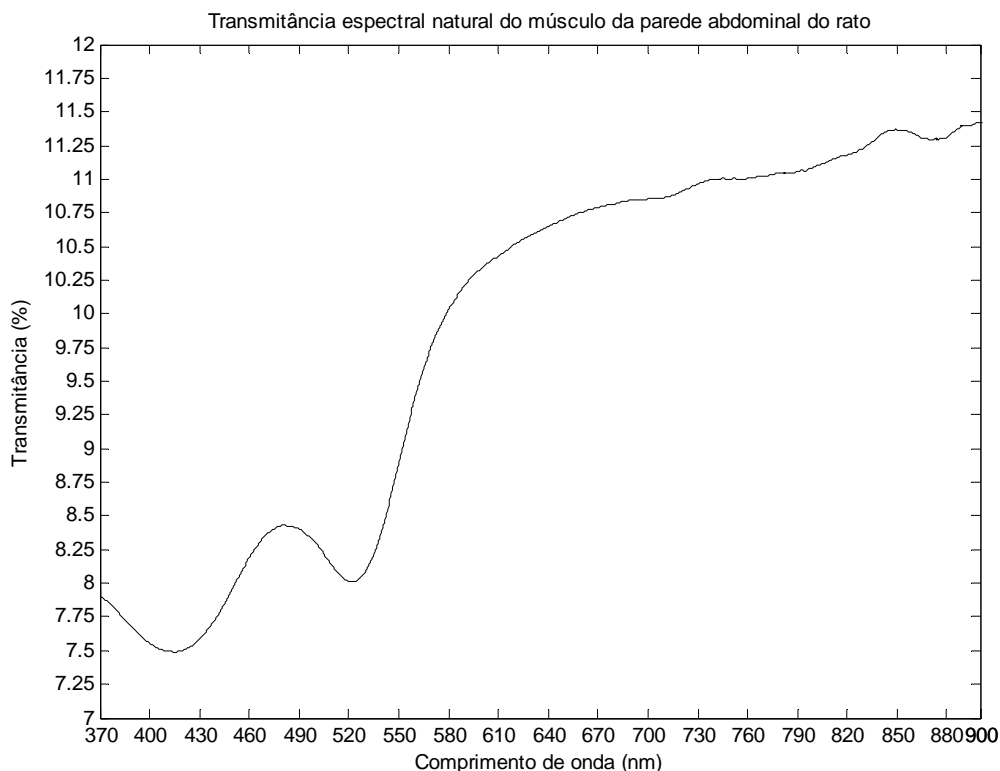


Figura 6: Transmitância natural do músculo da parede abdominal do rato

Este será o espectro característico do efeito de transparência criado pelo agente para o instante  $t=0$ . De seguida, inserimos o agente osmótico a estudar na superfície superior do tecido recorrendo a uma seringa. O agente é aplicado topicamente sobre a superfície superior do tecido e rapidamente se espalha por toda esta superfície e também pela superfície inferior, criando assim um banho de agente osmótico em volta do tecido. A aplicação do agente é feita cuidadosamente para não se criarem bolhas de ar que possam afectar as medições. O tecido fica imerso logo após termos finalizado a aplicação do agente, considerando-se nesse instante o início do tratamento osmótico por imersão. Nessa altura, começamos a registar medições em transmissão a cada 5 segundos durante os dois primeiros minutos e posteriormente de 10 em 10 segundos entre o segundo e o sétimo minutos após o instante de aplicação do agente sobre o tecido. A partir do sétimo minuto, as medições são efectuadas a cada 30 segundos até que seja verificado que o espectro de transmitância já se encontra em regime linear de saturação há algum tempo. Note-se que o nível de grandeza do espectro de transmitância do tecido e possivelmente a sua forma irão variar durante o período de tempo em que o agente em estudo se difunde para o interior do tecido, sendo esta variação mais acentuada nos primeiros minutos de imersão. O término das medições realizadas nos tecidos imersos depende do

agente administrado. Poderá ocorrer passados 15 minutos, 20 ou 30, conforme verificamos nos estudos preliminares realizados. A escolha de uma cadência apertada nos primeiros minutos de imersão servirá para detectar possíveis oscilações no processo evolutivo do efeito a observar. Estas oscilações foram detectadas em estudos preliminares realizados e poderão estar relacionadas com fases distintas do processo de criação do efeito de transparência que estão descritas na literatura <sup>(1, p:x-xi)</sup>.

Uma vez terminado este processo, o tecido é retirado da montagem experimental e os espectros medidos são guardados numa pasta do disco rígido para posterior processamento. Os tecidos estudados são colocados entre lâminas de microscópio para posterior processamento com o objectivo de serem mais tarde fotografados em corte no microscópio para avaliação histológica. Toda a montagem experimental é limpa com Álcool Etílico e posteriormente com Soro Fisiológico, para eliminar eventuais detritos do agente que foi administrado. Tal limpeza dos suportes mecânicos e fibras ópticas garante a não contaminação para o estudo a ser realizado posteriormente.

Esta sequência de medições é feita para todos os tecidos a serem tratados nas diferentes soluções osmóticas a ser estudadas no estudo experimental em causa. Para os cinco estudos em que serão analisados os efeitos de transparência criados por diferentes soluções osmóticas realizamos este método experimental de medição para os tecidos natural e imersos em Glicerina 50%, Glucose 40%, Etileno Glicol 99%, Propileno Glicol e Mistura de Etanol com Glicerina e Água destilada, como descrito na tabela 6. No caso do estudo da dependência entre o efeito criado e a concentração do agente em solução, seguimos o mesmo método, mas agora administrando sucessivamente a diferentes tecidos a Glicerina e o Etileno Glicol nas concentrações de 50%, 75% e 87%, conforme está descrito na tabela 4.

Se observarmos a figura 6 apresentada acima com algum cuidado, podemos retirar informações importantes. Em primeiro lugar, a forma do espectro é perfeitamente característica de um tecido fibroso, como seria de esperar <sup>(1, p:24)</sup>. Podemos depois verificar a existência de duas bandas de absorção centradas aproximadamente em 415 e 525 nm. Estas bandas de absorção correspondem à hemoglobina existente no sangue interno ao tecido e foram já observadas em outros estudos <sup>(1, p:58)</sup>. Os comprimentos de onda centrais destas bandas observados em outros estudos não se afastam muito dos valores verificados na figura 6. As variações que podem verificar-se entre estudos devem-se à constituição da hemoglobina analisada em cada amostra que varia de caso para caso devido a diferentes proveniências das amostras estudadas. Devemos aqui

referir, que o tecido analisado para representar o espectro da figura 6, apresentava uma grande quantidade de sangue no seu interior, o que não acontece para os tecidos utilizados durante todo o estudo experimental realizado. Desta forma, não iremos observar estas bandas nos espectros referentes aos estudos, pelo menos não de forma tão acentuada.

### **3.10 Registo de parâmetros finais**

Uma vez terminado o estudo óptico, é necessário avaliar os parâmetros ópticos e químicos do tecido após o tratamento osmótico, para podermos calcular as variações correspondentes que ocorreram em consequência da actividade química interna proporcionada pela difusão dos agentes osmóticos para o interior dos tecidos. São então novamente medidos a massa e o pH dos tecidos tratados osmoticamente em cada estudo experimental. Os tecidos do tipo H considerados na tabela 6 são apenas avaliados em termos de massa após a imersão nos agentes. Os valores da espessura final de cada tecido serão avaliados através das fotografias microscópicas depois de realizados os cortes histológicos.

O índice de refacção dos tecidos a medir quer para a situação natural, quer para os casos após tratamento osmótico foi realizado com o refractómetro de Abbe num estudo posterior e independente, conforme anteriormente foi referido. Como o tratamento osmótico e o efeito criado nos tecidos deve ocorrer sempre da mesma forma para cada agente e com as mesmas condições experimentais, as medições a obter para o índice de refacção poderão ser associadas aos diversos estudos experimentais que pretendemos fazer. Assim, depois de caracterizados os tempos necessários à estabilização espectral após a criação do efeito temporário de transparência por cada agente químico, recolhemos várias amostras de tecido para tratá-las num só dia e posteriormente submetê-las à avaliação do índice de refacção no refractómetro de Abbe. O número de tecidos e o tratamento que lhes será aplicado antes da avaliação do índice de refacção encontra-se descrito na tabela 7. Note-se que nesta tabela o número de tecidos é de 11, visto que iremos medir o valor do índice de refacção para um tecido no seu estado natural e nos 10 tecidos onde foram aplicados os tratamentos com cada uma das soluções osmóticas utilizadas em todos os estudos experimentais ópticos realizados. O volume de agente será o dobro do volume estimado para os tecidos, tal como nos

estudos experimentais realizados. Os tecidos são catalogados com a sequência de nomes de R1 a R11, para evidenciar que se destinam ao estudo com o refractômetro.

Tabela 7: Tecidos e respectivo tratamento para a medição do índice de refração

Tecidos	Tratamento	$\frac{\text{Volume de Agente}}{\text{Volume de Tecido}}$
R1	Tecido Natural	-----
R2	Glicerina 50%	2
R3	Glicerina 75%	2
R4	Glicerina 87%	2
R5	Glucose 40%	2
R6	Etileno Glicol 50%	2
R7	Etileno Glicol 75%	2
R8	Etileno Glicol 87%	2
R9	Etileno Glicol 99%	2
R10	Propileno Glicol	2
R11	Solução de Etanol, Glicerina e Água Destilada nas proporções 1:1:2	2

Estes tecidos foram imersos nas soluções correspondentes durante 30 minutos. Este intervalo de tempo foi verificado ser suficiente para atingir o regime de saturação da transparência criada para todos os agentes considerados. Depois foram sequencialmente colocados entre os prismas do refractômetro de Abbe e iluminando com o laser vermelho para aumentar o contraste, tiramos leituras do índice de refração para cada caso. Depois de medidos os valores correspondentes a cada caso, calculámos a variação que ocorreu para o índice de refração para todos os tratamentos aplicados e relacionámos tais variações com os estudos realizados anteriormente.

Todos os parâmetros medidos antes e depois de cada estudo, tanto para os tecidos, como para os agentes osmóticos ficam registados numa ficha de estudo individual que cada tecido tem em cada dia de estudo. Os dados aqui registados, ficam organizados para podermos calcular as variações ocorridas nos tecidos devido aos tratamentos aplicados.



### 3.11 Pós – processamento dos tecidos

Após cada estudo experimental, os tecidos devem ser processados para podermos avaliar os efeitos histológicos que ocorreram no seu interior devido aos tratamentos aplicados. Todos os tecidos considerados num determinado estudo experimental são submetidos a este pós-processamento e consequente estudo de avaliação. Para que tal seja possível, torna-se necessário proceder com técnicas e conhecimentos de prática comum no Instituto de Histologia e Embriologia Abel Salazar. Assim e com a cooperação do pessoal deste Instituto, aprendemos as técnicas necessárias e as implementamos nos tecidos utilizados nos nossos estudos. A metodologia adoptada segue diversos passos de preparação e encontra-se descrita de seguida:

A primeira fase de pós-processamento dos tecidos consiste em mergulhar as lâminas que os contém num líquido designado Líquido de Bouin. Este líquido apresenta uma constituição de Formol comercial em 5 partes de volume (200 cc), Solutio Aquoso saturado de Ácido Pícrico em 15 partes de volume (600 cc) e Ácido Acético em uma parte de volume (40 cc). A imersão dos tecidos neste líquido é um processo que leva 12 horas (no mínimo) para fixar as células e endurecer o tecido para posterior processamento. Após este período, os tecidos são submetidos a um processo de imersão em diferentes concentrações de Álcool para conseguirmos uma desidratação completa. Neste processo começa-se por colocar os tecidos dentro de um recipiente contendo álcool a 70% durante 15 minutos. Esta imersão é repetida duas vezes em outros recipientes com álcool na mesma concentração durante o mesmo período de tempo. Posteriormente, passa-se a colocar os tecidos em imersão sucessivamente dentro de três recipientes contendo álcool a 90% durante períodos de 10 minutos. Depois, repete-se o processo em três recipientes contendo álcool a 100%. Nesta altura os tecidos estão completamente desidratados. Após este processo de desidratação, os tecidos são imersos em Benzol para permitir a entrada de parafina que irá sustentar o tecido para proceder aos cortes. Este processo de imersão em Benzol é feito em duas fases com uma duração de 5 minutos cada. Nesta fase, os tecidos são incluídos em blocos de parafina. Estes blocos depois de endurecidos são submetidos ao processo de corte para obter as secções transversais de cada tecido. Depois de feitos os cortes, as secções transversais dos tecidos (incluídos no filme de parafina) passam a ser preparados para

corar. Inicia-se este processo imergindo as lâminas com os tecidos e filme de parafina em Xylol durante 10 minutos, para que a parafina fique transparente. Este processo é otimizado com a imersão subsequente em álcool absoluto durante 10 minutos e posterior imersão em álcool a 90% durante outros 10 minutos. Finalmente realiza-se uma imersão em água durante 15 minutos. Inicia-se aqui o processo de corar, começando por submeter as laminas com o filme de parafina e tecido em Hematáina durante dois minutos para corar os núcleos das células. Posteriormente, as lâminas devem ser lavadas em água corrente durante 15 minutos, para retirar os resíduos de corante que ficaram espalhados pela lâmina. Finalmente, cada lâmina é imersa durante 30 segundos em Eosina a 1% para corar o citoplasma presente em cada secção transversal de tecido. Este processo espalha o corante em toda a lâmina que sustenta a parafina e o tecido. Torna-se necessário proceder a um processo de lavagem para eliminar o corante fora do tecido. Isto é feito com lavagens sucessivas em álcool a 90%. Posteriormente são lavadas em álcool absoluto e finalmente em xylol até que as lâminas fiquem completamente transparentes. Resta agora sobrepor outra lâmina mais fina à zona onde se encontra o corte do tecido para protecção. Esta lâmina fina é fixada à outra com verniz e necessita de algum tempo para que o verniz seque. No final, as lâminas encontram-se em condições de serem observadas em microscópio.

### **3.12 Tratamento de resultados obtidos no estudo óptico**

Depois de realizadas todas as medições experimentais iremos processar os resultados obtidos de forma a caracterizarmos os efeitos de transparência criados pelos tratamentos químicos realizados. Todo o processamento dos espectros medidos será feito com programas desenvolvidos em MATLAB<sup>TM</sup> para o efeito. Estes programas encontram-se no anexo C do presente trabalho. Cada um destes programas lê, do disco do computador, os ficheiros que contém os espectros medidos para cada instante de tempo e para cada tecido experimentado. Como resultados, os programas representam os espectros medidos ao longo do tempo para a mesma combinação tecido – agente e também gráficos de evolução temporal da transmitância do tecido para comprimentos de onda específicos, previamente escolhidos. Com estes gráficos podemos interpretar o efeito de transparência criado por cada agente em função da variação temporal da transmitância e também das variações ocorridas nos parâmetros medidos no tecido em estudo.

Para os cinco estudos realizados com as diferentes soluções químicas, procedemos ao cálculo de uma evolução temporal média do espectro de transmitância, assim como para as curvas de evolução temporal da transmitância verificada nos comprimentos de onda que escolhemos uniformemente ao longo da banda de medição do espectrofotómetro. Este procedimento foi adoptado para cada agente químico utilizado. Para além destes gráficos iremos também calcular e representar os gráficos de desvio em relação à evolução média calculada que cada estudo em particular apresenta. Foram também calculadas as variações médias dos restantes parâmetros para cada agente estudado: massa do tecido, espessura do tecido, pH do tecido, diâmetro das fibras musculares e sua densidade dentro do tecido. A variação de índice de refacção será também apresentada para cada caso.

### **3.13 Estudo Histológico dos efeitos criados**

Conforme anteriormente foi referido, todos os tecidos que foram tratados osmoticamente, assim como os que foram mantidos no seu estado natural durante os estudos experimentais realizados foram processados para serem observados ao microscópio. Tal observação é feita em cortes transversais obtidos de cada tecido biológico. Por registo fotográfico com diferentes ampliações do microscópio, podemos estudar as variações que possam ter ocorrido no interior dos tecidos a nível histológico devido ao tratamento osmótico a que os tecidos foram submetidos. Para além das fotografias registadas para cada tecido, fotografamos também com as mesmas ampliações uma escala de comprimentos para podermos realizar medições de comprimento.

O primeiro parâmetro a avaliar é a espessura do tecido. Na literatura é referido que os tecidos tratados osmoticamente sofrem variações de espessura <sup>(1, p:19-22) (46)</sup>. Desta forma, foram impressas à mesma escala imagens dos tecidos com ampliação de 2x e também da escala de comprimentos em folha transparente para podermos sobrepor às fotografias impressas dos tecidos.

Medimos a espessura em vários pontos ao longo do corte transversal de cada fotografia dos tecidos naturais e também nos tecidos tratados osmoticamente para avaliar se ocorreram variações na espessura média calculada. Por outro lado, e para as fotografias adquiridas com uma ampliação de 10x, avaliamos visualmente o diâmetro médio das

fibras musculares em cada um dos diversos tecidos, para determinar se este diâmetro médio sofreu variações devido ao tratamento osmótico. Este estudo, é feito apenas de forma visual, visto que os diâmetros das várias fibras dentro de um mesmo tecido, poderão variar e algumas poderão não estar representadas em secção recta perfeita devido às diferentes orientações das fibras dentro do tecido. Perante esta situação procedemos apenas com uma estimativa acerca de eventuais variações do diâmetro médio das fibras devido ao tratamento osmótico.

Finalmente, iremos determinar para os tecidos naturais e tratados qual a densidade de fibras musculares por unidade de área em cada caso. Com estes valores poderemos comparar entre os tecidos naturais e cada tecido tratado por um agente em particular se ocorreu alguma variação na distribuição média de fibras musculares por unidade de área dentro do tecido. Esta informação será depois correlacionada com os diferentes efeitos de transparência criados e medidos opticamente por cada agente em particular.

Os parâmetros que referimos serão também comparados entre os tecidos dos grupos H e O considerados nos estudos de caracterização e comparação dos efeitos produzidos pelos diferentes agentes. Esta comparação servirá para avaliar se algum efeito directamente relacionado com a radiação inserida nos tecidos do grupo O pode ser discriminado na análise histológica dos tecidos.

### **3.14 Correlação do efeito óptico com as variações histológicas, mecânicas e biológicas ocorridas nos tecidos**

Uma vez reunida a informação dos estudos ópticos e das fotografias colhidas em microscópio, correlacionamos e caracterizamos os efeitos de transparência criados em cada caso estudado. Desta correlação serão induzidas conclusões importantes para explicar como os diferentes tratamentos aplicados proporcionam aos tecidos tornar-se mais transparentes. Tal correlação foi feita para cada caso, independentemente do tratamento adoptado. No entanto, comparamos posteriormente a informação reunida com esta correlação entre casos onde foram aplicados tratamentos com soluções químicas distintas ou entre tecidos tratados com químicos idênticos em diferentes concentrações, para melhor interpretarmos os efeitos causados no interior dos tecidos, estimar a difusão dos químicos para o interior dos tecidos e proporções dos efeitos por eles causados. Para o caso dos tecidos tratados com soluções do mesmo tipo, mas em

concentrações distintas, pudemos com toda a informação reunida estabelecer uma relação de dependência entre os efeitos criados e a concentração do agente.

Em face das correlações realizadas entre a evolução temporal dos espectros de transmitância para cada agente químico estudado, a variação de parâmetros como a massa, a espessura, o pH e o índice de refração dos tecidos e também a informação obtida das fotografias histológicas caracterizamos o efeito de transparência criado por cada agente químico. Esta caracterização tem em conta a percentagem que a transmitância evolui em relação ao seu estado natural, o tempo necessário para a criação dessa transmitância, o estado de desidratação atingido pelo tecido, as variações mecânicas, ópticas e químicas que o tecido sofreu e também as alterações histológicas por que passou.

### **3.15 Comparação de efeitos entre tecidos tratados com o mesmo agente em diferentes concentrações**

Depois de caracterizado o efeito de transparência com a reunião de informação de diversa natureza, efectuamos comparações entre os efeitos criados pela Glicerina e Etileno Glicol nas diferentes concentrações estudadas. Estudamos inicialmente a grandeza do efeito criado por cada um destes agentes nas diferentes concentrações, para verificar se é possível estabelecer uma relação de dependência entre o efeito criado por cada um destes agentes e a sua concentração. Esta dependência existe e foi caracterizada. Por outro lado, estabelecemos uma comparação entre os efeitos criados pelos dois agentes aplicados em solução com as mesmas concentrações. Desta forma foi possível avaliar qual dos dois agentes proporciona a criação de um efeito mais pronunciado. Nesta comparação verificamos os tempos necessários à criação do efeito de transparência por cada agente e quantificamos a transparência criada por cada um nas diferentes situações de concentração utilizadas.

Com este tipo de comparações pretendemos posteriormente identificar que agente e em que concentração podem ser utilizados em certos tipos de aplicação clínica. A criação de metodologias de aplicação destes agentes em tais aplicações clínicas será considerada para futuros desenvolvimentos de investigação e desenvolvimento.

### **3.16 Comparação de efeitos entre tecidos tratados com diferentes agentes**

Para os cinco estudos experimentais realizados com diferentes agentes osmóticos em solução efectuamos algumas comparações importantes para futuros desenvolvimentos clínicos. Uma vez que calculamos efeitos médios por agente e dispúnhamos de informação diversa para caracterizar cada efeito, pudemos no final comparar entre os tecidos dos grupos O e H da tabela 6. Esta comparação foi feita apenas com parâmetros médios tirados das fotografias histológicas dos tecidos, para avaliar se para o mesmo tratamento aplicado se verifica algum efeito devido à passagem de radiação óptica pelos tecidos do grupo O, considerando os tecidos do grupo H como referência.

Por outro lado, comparamos cada uma das grandezas médias calculadas entre tecidos tratados por diferentes agentes, para podermos quantificar as diferenças entre tratamentos distintos. Este tipo de comparação foi feito entre tecidos do mesmo grupo e para os grupos H e O independentemente, considerando como referências os tecidos H1 e O1 mantidos no estado natural. Retiramos desta comparação informação acerca do tempo necessário à difusão dos vários agentes e da grandeza do efeito criado por cada um. Os efeitos criados no interior dos tecidos foram também comparados, para avaliar quais agentes em solução actuam mais fortemente no interior e constituintes dos tecidos. Desta forma podemos determinar quais os efeitos que apresentarão uma reversibilidade mais demorada.

### **3.17 Conclusões e perspectivas futuras**

Depois de estudados os diferentes efeitos de transparência criados nos tecidos e após termos processado toda a informação recolhida experimentalmente para caracterizar cada um dos efeitos e efectuar comparações importantes entre diferentes casos, iremos se possível retirar conclusões acerca de cada caso, assim como das comparações feitas e identificar novas linhas de investigação e desenvolvimento nesta área. Iremos identificar eventuais falhas ou imperfeições no método experimental adoptado e apontar soluções para a sua resolução no futuro. Pretendemos indicar também alguns processos de investigação que não foram possíveis de realizar e referir métodos para a sua resolução. Por outro lado, dos resultados obtidos poderemos identificar novas direcções de investigação que merecerão o nosso interesse no futuro. Iremos estabelecer paralelismos relativamente à metodologia a adoptar na investigação de efeitos de transparência

temporária possíveis de ser criados em tecidos de diferente natureza e também para outros agentes que não foram utilizados no presente trabalho.

### **3.17.1 Interpretação de resultados obtidos e Conclusões**

Em face das caracterizações feitas para cada caso e das variações ocorridas nos parâmetros medidos, quantificamos parâmetros de cada efeito estudado, assim como comparamos com outros estudados nas mesmas condições. Para cada caso, identificamos as variações ocorridas a nível mecânico, químico ou histológico com o efeito de transparência observado opticamente. Por outro lado, correlacionamos a grandeza das variações ocorridas a nível dos diversos parâmetros estudados com a concentração dos agentes aplicados para os casos da Glicerina e do Etileno Glicol. A quantificação do tempo necessário para a criação do efeito, assim como a sua duração e grandeza relativamente ao estado natural do tecido, permitirão estudar casos de possível aplicação clínica. Iremos, estabelecer eventuais limitações aos efeitos observados experimentalmente para uma possível aplicação *in vivo*. Poderemos também criar analogias para casos de tecido muscular humano *in vivo*, transpondo as técnicas utilizadas na experimentação *in vitro* para o caso em que os tecidos se encontram em simbiose com tecidos circundantes no interior do corpo humano.

### **3.17.2 Perspectivas futuras de investigação e aplicação dos agentes estudados**

Uma vez concluído o estudo e depois de interpretadas e comparadas as variações ocorridas nos tecidos biológicos devido à administração dos diferentes agentes osmóticos, podemos perspectivar novas linhas de investigação nesta área da óptica médica, assim como idealizar e projectar áreas clínicas onde a aplicação dos efeitos de transparência criados possa beneficiar a prática de diagnóstico, terapia e cirurgia. Assim iremos preocupar-nos com a aplicação destes agentes em diferentes tipos de tecido, como a pele, a laringe, a faringe, a traqueia, o esófago e outros, onde a duração do efeito de transparência, a sua grandeza e variação de parâmetros internos de cada tecido serão certamente diferentes do caso estudado para o músculo da parede abdominal. Iremos considerar as alterações instrumentais e experimentais que devem ser realizadas para a transposição dos estudos realizados para os casos mencionados numa situação *in vivo*.

Como exemplo, a medição óptica dos espectros de transmissão óptica será impraticável numa situação *in vivo*. Iremos também discutir a possibilidade de criação de um aplicador/doseador de agentes osmóticos para certas aplicações clínicas onde as tecnologias ópticas assumem um papel importante, como por exemplo a cirurgia laser, o fotodiagnóstico e a fototerapia. Dentro desta discussão irão surgir novas questões que merecerão ser investigadas, objectivando-se a criação de aplicações clínicas viáveis e eficazes.

Iremos discutir futuros estudos, onde será feita uma avaliação, interpretação clínica e quantificação dos danos causados pelos tratamentos aos tecidos e sua implicação clínica quer para casos *in vitro*, quer para a situação análoga *in vivo*. Poderemos investigar em futuros estudos, se a reversibilidade do processo por adição de água permite reverter os eventuais danos causados.



## **Capitulo 4: Estudo Experimental**

## 4 Estudo experimental

Neste capítulo vamos apresentar os resultados obtidos nos estudos realizados. Antes de se proceder com os estudos de imersão dos tecidos nos agentes osmóticos, necessitamos de caracterizar o estado natural do tecido para obtermos uma referência relativamente aos efeitos temporários de transparência criados. Assim começamos por expor os resultados obtidos no estudo da constituição do tecido e das suas propriedades ópticas. Posteriormente iremos mostrar os resultados obtidos nos estudos em que foram aplicados tratamentos com diferentes concentrações de Glicerina e Etileno Glicol, tentando caracterizar o efeito de transparência criado em função da variação temporal da transmitância e também das variações ocorridas nos diversos parâmetros. Finalmente iremos apresentar os resultados obtidos nos estudos com diferentes agentes osmóticos, de forma a podermos caracterizar e comparar os efeitos obtidos.

### 4.1 Avaliação dos parâmetros do tecido no seu estado natural <sup>(54)</sup>

Para caracterizarmos os efeitos de transparência criados pelos diversos agentes osmóticos utilizados, é necessário medir e quantificar certas características do tecido natural, para posteriormente avaliarmos as variações ocorridas. Assim, realizamos um estudo sobre uma amostra de tecido, onde foram medidas a massa e o índice de refração nos vários estados consecutivos de desidratação.

Começamos por avaliar o índice de refração e a massa deste tecido, para servirem de referência aos estados seguintes. Para estas medições secou-se previamente o exterior do tecido com papel absorvente para garantir que os valores medidos correspondem unicamente ao tecido e em particular aos constituintes no seu interior. Os valores obtidos foram:

$$\text{massa}=0.1623 \text{ g}$$

$$n=1.3980$$

A incerteza nas medições realizadas é imposta pela incerteza dos instrumentos utilizados. Assim para a balança utilizada, temos uma incerteza de 0.0001 gramas e para o refractómetro de Abbe temos uma incerteza de 0.0001.

Com um secador de cabelo, desidratamos um pouco o tecido para realizar novas medições de massa e de índice de refração. Este processo foi repetido até serem

obtidos dez pares de valores correspondentes a dez estados de desidratação consecutivos. Estes valores encontram-se na tabela 8.

Tabela 8: Valores de massa e índice de refração do tecido medidos em diferentes estados de desidratação

<b>Estado de desidratação</b>	<b>Índice de refração</b>	<b>Massa</b>
1	1.3995	0.1455
2	1.4105	0.1361
3	1.4200	0.1252
4	1.4295	0.1144
5	1.4410	0.1053
6	1.4525	0.0955
7	1.4640	0.0860
8	1.4785	0.0747
9	1.4910	0.0654
10	1.5035	0.0551

Se considerarmos a equação 8, verificamos que sendo conhecido o valor do índice de refração da água e do tecido no seu estado natural, restam duas variáveis desconhecidas na equação. Trata-se do índice de refração dos constituintes sólidos do tecido e da fracção em volume da água presente no tecido natural. A fracção em volume dos constituintes sólidos do tecido é também desconhecida, mas pode ser calculada a partir da fracção em volume de água pela relação  $f_{\text{água}} + f_{\text{sólido}} = 1$ . O índice de refração da água depende do comprimento de onda de referência da instrumentação utilizada na sua medição. Para o refractómetro de Abbe, utilizado para medir os valores do índice de refração dos agentes e dos tecidos, o comprimento de onda de referência é 589 nm. Para obtermos um valor do índice de refração da água consistente com as restantes medições realizadas ao longo do trabalho, podemos proceder de duas formas: medir este valor com o mesmo instrumento ou calculá-lo pela equação 9 utilizando o comprimento de onda de referencia. Nestas condições, o valor calculado é de 1.3330 para o índice de refração da água. Não realizamos a medição deste valor, pois não nos foi possível recolher uma amostra da água no interior das amostras de tecido. Qualquer outra amostra de água poderia originar um valor não correspondente à realidade dos tecidos devido à presença de minerais por exemplo.

Visto que a equação 8 pode ser aplicada a cada estado de desidratação indicado na tabela 8, poderemos resolver vários sistemas de 2 equações a 2 incógnitas para determinar pares de valores do índice de refração dos constituintes sólidos e da fracção em volume de água no estado natural. Tais valores serão processados estatisticamente para obtermos um valor médio de cada um. Em cada um dos sistemas aplicamos a equação 8 a dois estados de desidratação, figurando em cada equação como incógnitas a fracção em volume de água e o índice de refração dos constituintes sólidos. Com os valores de massa medidos, podemos calcular as fracções em volume de água presentes em cada estado de desidratação pela relação seguinte:

$$f_{H_2O}^i = f_{H_2O_{natural}} - \frac{m_{natural} - m^i}{m_{natural}} \quad \text{Equação 12}^{(39)}$$

que constitui uma correcção à equação 11. Nesta equação determinamos a fracção de água presente em cada estado de desidratação  $i$ , pela subtracção entre a fracção de água presente no estado natural do tecido e a água que saiu por desidratação. Esta porção de água que saiu do tecido no processo de desidratação é calculada pelo quociente da equação anterior. Com este cálculo, podemos determinar para cada estado de desidratação do tecido a fracção de água presente como sendo a diferença entre a fracção de água presente no estado natural (este parâmetro é desconhecido mas mantém-se constante para qualquer caso de desidratação) e uma constante numérica determinada pelas medições de massa em cada estado de desidratação. Para aplicarmos os valores calculados desta forma e os índices de refração representados na tabela 8 a sistemas de equações com as incógnitas  $f_{H_2O_{natural}}$  e  $n_{solido}$ , teremos diversas possibilidades de combinação. Na realidade, para os 10 pares de valores medidos, teremos 45 combinações possíveis de sistemas de equações, se considerarmos o número de combinações que a estatística nos permite obter:

$${}^nC_p = \frac{n!}{p!(n-p)!} \quad \text{Equação 13}^{(55, p: 15)}$$

sendo  ${}^nC_p$  o número de combinações possíveis, com  $n=10$  e  $p=2$ . Desta forma, resolvemos todos os 45 sistemas possíveis, obtendo 45 pares de valores para  $f_{H_2O_{natural}}$  e  $n_{solido}$ , calculando no final a média desses valores. Os valores calculados pela resolução dos sistemas encontram-se na tabela 9:

Tabela 9: Valores calculados pela resolução dos 45 sistemas de equações para a fracção de agua em tecido natural e índice de refração dos constituintes sólidos

Combinação	$f_{H_2O_{natural}}$	$n_{solido}$	Combinação	$f_{H_2O_{natural}}$	$n_{solido}$
1:2	0.7535	1.5230	3:10	0.7786	1.5263
1:3	0.6977	1.4969	4:5	0.8243	1.5380
1:4	0.6788	1.4896	4:6	0.8063	1.5304
1:5	0.7066	1.5005	4:7	0.8056	1.5301
1:6	0.7169	1.5050	4:8	0.8134	1.5333
1:7	0.7255	1.5089	4:9	0.8214	1.5367
1:8	0.7363	1.5141	4:10	0.8186	1.5355
1:9	0.7448	1.5184	5:6	0.7840	1.5234
1:10	0.7473	1.5197	5:7	0.7929	1.5264
2:3	0.6132	1.4744	5:8	0.8083	1.5319
2:4	0.6160	1.4751	5:9	0.8203	1.5364
2:5	0.6791	1.4937	5:10	0.8167	1.5351
2:6	0.6997	1.5009	6:7	0.8037	1.5296
2:7	0.7142	1.5063	6:8	0.8228	1.5360
2:8	0.7302	1.5128	6:9	0.8361	1.5407
2:9	0.7420	1.5178	6:10	0.8284	1.5379
2:10	0.7455	1.5193	7:8	0.8413	1.5413
3:4	0.6196	1.4759	7:9	0.8544	1.5458
3:5	0.7207	1.5043	7:10	0.8386	1.5405
3:6	0.7387	1.5106	8:9	0.8727	1.5512
3:7	0.7511	1.5152	8:10	0.8366	1.5400
3:8	0.7659	1.5210	9:10	0.7944	1.5299
3:9	0.7772	1.5257			

Para cada um dos dois parâmetros da tabela 9 e considerando os 45 valores obtidos nos cálculos, calculamos a média <sup>(56, p:27)</sup>:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad \text{Equação 14}$$

Para calcularmos o desvio padrão para cada um dos dois parâmetros considerados na tabela 9, iremos utilizar a seguinte relação <sup>(56, p: 29)</sup>:

$$dp = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Equação 15}$$

Os valores médios e respectivos desvios padrão calculados a partir destes pares de valores são:

$$\begin{aligned} \langle f_{\text{H}_2\text{O natural}} \rangle &= 0.77 & dp(f_{\text{H}_2\text{O natural}}) &= 0.06 \\ \langle n_{\text{sólido}} \rangle &= 1.5201 & dp(n_{\text{sólido}}) &= 0.02 \end{aligned}$$

O valor de fração em volume dos constituintes sólidos presente no tecido no seu estado natural é de  $1 - f_{\text{H}_2\text{O natural}} = 0.23$ . Para este parâmetro consideramos o mesmo desvio padrão que foi determinado para a fração de água presente no tecido natural.

Isto significa que o tecido fica caracterizado para o seu estado natural com os seguintes valores:

Tabela 10: Parâmetros que caracterizam o tecido natural

$n_{\text{natural}}$	$f_{\text{H}_2\text{O natural}}$	$f_{\text{sólido}}$	$n_{\text{sólido}}$
1.3980	0.77	0.23	1.5201

Note-se que o valor para a percentagem de água presente no tecido natural não é muito diferente do valor medido experimentalmente para o músculo de rato, tal como é descrito na literatura com o valor de 0.756<sup>(39)</sup>.

#### 4.2 Estudo comparativo entre efeitos de dois agentes em diferentes concentrações<sup>(54)</sup>

Conforme já referimos, pretendemos com este estudo caracterizar os efeitos de transparência criados por três soluções de Glicerina e três de Etileno Glicol com diferentes concentrações. Utilizamos soluções de cada um dos agentes nas concentrações de 50%, 75% e 87% que foram preparadas na altura da realização deste estudo. Para cada caso particular deste estudo foram medidos a massa e o pH dos tecidos antes e depois do tratamento osmótico, para avaliar variações destes parâmetros. Os tecidos foram depois do estudo óptico em transmissão processados e fotografados em corte no microscópio óptico com as ampliações de 2x e 10x para avaliar variações na espessura e também alterações na disposição e tamanho das fibras musculares dentro do tecido devido a cada tratamento aplicado.

Para cada uma das soluções de Etileno Glicol e Glicerina consideradas neste estudo, realizou-se apenas um estudo experimental para cada caso, em que preparamos com um criostato 6 cortes de tecido para serem imersos nas referidas soluções e avaliados ao longo do tempo em transmissão espectral óptica. Preparamos também um tecido no seu

estado natural para ser considerado como referência na análise dos parâmetros histológicos. Começamos por descrever a situação histológica do tecido natural.

#### 4.2.1 Quantificação de parâmetros histológicos do tecido natural

O tecido natural foi fotografado ao microscópio com as ampliações de 2x e 10x para podermos realizar medições da sua espessura e também da distribuição e dimensão das fibras no seu interior. As fotografias obtidas para o tecido natural estão representadas na figura seguinte:

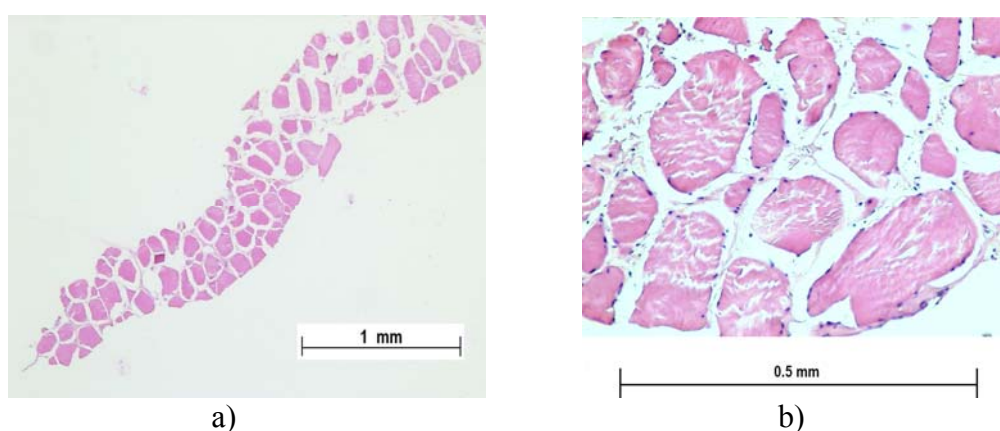


Figura 7: Fotografias do tecido natural: a) com ampliação 2x, b) com ampliação de 10x

Iniciamos a análise histológica estudando a fotografia com ampliação de 2x. Numa montagem em contraluz efectuamos medições pontuais de espessura ao longo do tecido apresentado na fotografia, sobrepondo a escala de comprimento. Esta escala foi fotografada no mesmo microscópio e com a mesma ampliação. As impressões em papel foram feitas com a mesma ampliação para garantir concordância nas medições. As medições pontuais obtidas da espessura do tecido natural encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 11: Medições pontuais da espessura feitas sobre o tecido natural

Medições pontuais da espessura									
0.40	0.45	0.47	0.45	0.45	0.60	0.65	0.50	0.55	0.60

O valor médio calculado para a espessura do tecido é:

$$\langle d_{\text{natural}} \rangle = 0.512 \text{ mm}$$

Posteriormente passamos a estudar a fotografia do tecido com ampliação de 10x (fotografia b) da figura anterior). Dispomos também de uma fotografia da escala de comprimento com esta ampliação para realizar eventuais medições. Uma medição importante que podemos realizar sobre a fotografia do tecido, consiste em contar o número de fibras presentes na fotografia, pois esse número poderá variar com o tratamento dos tecidos. Por outro lado e considerando o estado natural do tecido, observamos a existência de fibras com diâmetros muito variáveis. Tendo já observado, outras fotografias do mesmo tipo de tecido, verificamos a existência de fibras que apresentam uma grande secção de forma aproximadamente rectangular. Trata-se de fibras cuja orientação longitudinal não é perpendicular à secção onde foi feito o corte transversal ao tecido. Em face destes dois aspectos que ocorrem naturalmente nos tecidos, torna-se difícil medir diâmetros das fibras no interior dos tecidos.

Desta forma iremos apenas contabilizar o número de fibras musculares presentes no tecido natural, para posteriormente compararmos com a quantidade correspondente medida nos diversos tecidos tratados. Esta comparação é possível, visto que a área é constante para todas as fotografias obtidas dos diversos tecidos considerados neste trabalho. Iremos também verificar visualmente em cada caso, qual a disposição das fibras no interior do tecido, para verificar se ocorre algum tipo de arranjo devido aos tratamentos aplicados. Os tratamentos a estudar poderão eventualmente obrigar as fibras a se agruparem em certas zonas preferenciais ou a terem uma distribuição menos concentrada no interior do tecido. Assim, para o tecido natural, verificamos uma distribuição homogénea de 25 fibras pela área apresentada na fotografia. Note-se que esta área da fotografia será sempre a mesma para todas as fotografias registadas com ampliação de 10x, pelo que podemos considerar uma área unitária e comparar o número de fibras presentes para os diferentes casos estudados.

Agora poderemos estudar os vários casos em que foi aplicado tratamento osmótico aos tecidos e depois comparar os parâmetros histológicos com os que até aqui apresentamos para o tecido natural, para identificar variações relacionadas com o tratamento aplicado.

#### **4.2.2 Etileno glicol**

Os 3 primeiros tecidos foram imersos nas soluções de Etileno Glicol durante a avaliação da sua transmissão óptica. Cada um destes casos estudados encontra-se apresentado



abaixo, onde expomos os parâmetros medidos antes e após a imersão, assim como a variação da transmitância ao longo do tempo devido ao tratamento.

#### 4.2.2.1 Solução com concentração de 50%

Esta solução de Etileno Glicol apresenta os seguintes valores de pH e índice de refração:

Tabela 12: Parâmetros medidos na solução de Etileno Glicol 50%

<b>Parâmetros medidos no agente</b>	
<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
6.39 a 24.6°C	1.3830

Os parâmetros do tecido no seu estado natural encontram-se representados na tabela 13:

Tabela 13: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Etileno Glicol 50%

<b>Parâmetros iniciais do tecido</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.16 g	6.20 a 22.6°C	1.3980

O estudo óptico em transmissão foi feito de acordo com o descrito na metodologia. Os espectros obtidos foram processados com o programa feito em MATLAB (ver anexo C) para obtenção das curvas de evolução temporal da transmitância do tecido. Estas curvas encontram-se representadas nas figuras seguintes.

Começamos por representar as curvas de evolução da transmitância para um conjunto de comprimentos de onda adoptados para todos os estudos experimentais. Estes comprimentos de onda foram seleccionados com uma distribuição uniforme dentro da banda espectral de medição do espectrofotómetro utilizado. A figura seguinte apresenta a evolução da transmitância para o período de tempo total em que o tecido esteve imerso na solução. Os pontos considerados nesta representação foram medidos experimentalmente a cada minuto durante o tratamento.

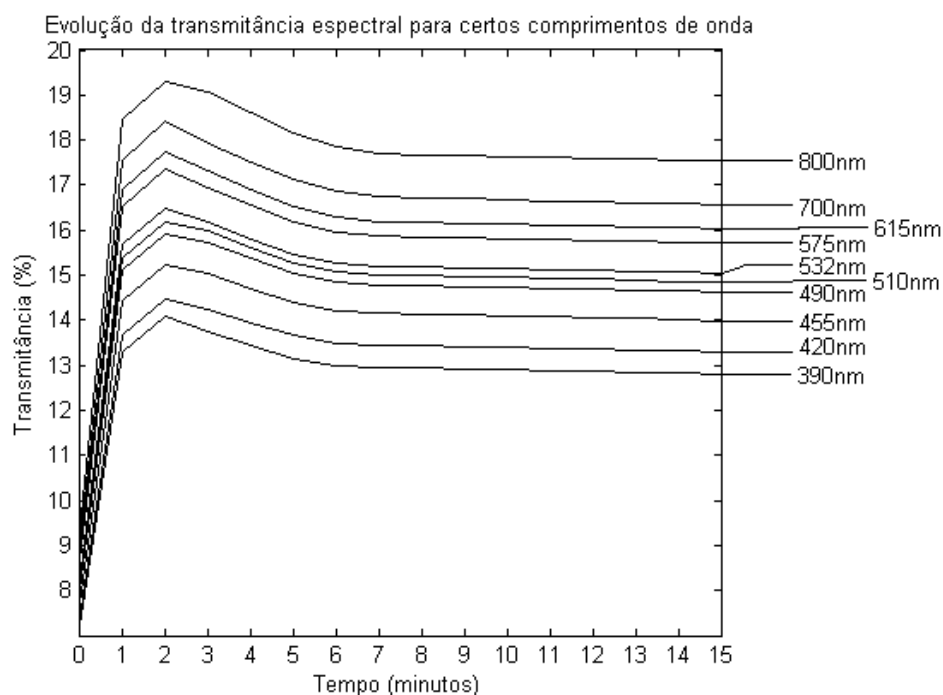


Figura 8: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 50%

Podemos observar na figura anterior que a transmitância do tecido sobe rapidamente no primeiro minuto chegando a valores quase duplos dos verificados naturalmente para os mesmos comprimentos de onda. Esta transmitância apresenta uma tendência crescente menos acentuada entre o primeiro e o segundo minutos de imersão. Tal tendência indica que o agente se difunde mais dificilmente para o interior do tecido. A partir do segundo minuto, verificamos um decréscimo evidente na transmitância até os 6 a 7 minutos de tratamento, entrando a partir daqui a transmitância no regime linear de saturação. Este regime traduz a ocorrência de saturação na difusão do agente para o interior do tecido, verificando-se uma igualdade de concentrações do agente dentro e fora do tecido. Note-se que para todos os comprimentos de onda escolhidos se verifica o mesmo tipo de comportamento, o que traduz a não alteração da forma espectral na escala de tempo considerada.

Por outro lado, podemos observar na figura seguinte como evolui em detalhe a transmitância do tecido nos primeiros 110 segundos de tratamento.

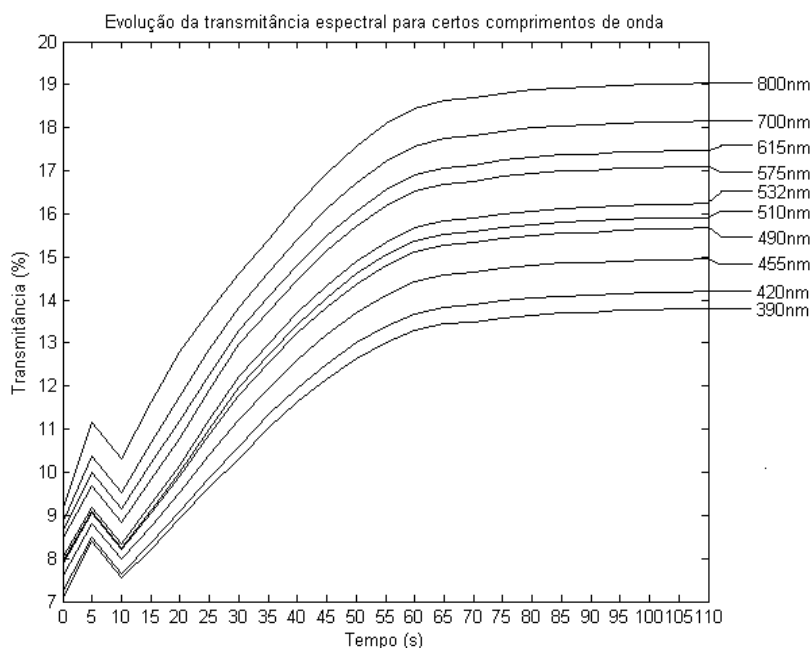


Figura 9: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 50% nos primeiros 110 segundos de tratamento

A figura 9 apresenta a variação da transmitância para os primeiros instantes de tratamento osmótico com valores representados correspondentes a medições realizadas a cada 5 segundos desde o instante inicial de tratamento. Podemos observar que o comportamento também é semelhante nesta escala de tempo para todos os comprimentos de onda seleccionados. Por outro lado, verificamos um aumento inicial da transmitância seguido de uma diminuição. Posteriormente, a tendência é crescente até o primeiro minuto de tratamento passando a valores quase duplos dos 10 para os 60 segundos após a adição do agente osmótico. Do 1º minuto em diante, verifica-se uma tendência crescente muito menos acentuada, o que indica o início do equilíbrio de concentrações do agente dentro e fora do tecido. Todo o comportamento verificado na figura 9 está de acordo com o que foi já verificado na figura 8, embora reste explicar a oscilação verificada entre o instante inicial e os 10 segundos de tratamento.

Conforme foi já descrito na literatura <sup>(1, p:x-xi)</sup>, a criação do efeito de transparência engloba dois processos independentes: desidratação do tecido e adaptação de índices de refração. À luz desta descrição, podemos concluir que a imersão do tecido no agente, estimula a desidratação, que ocorre nos primeiros instantes de tratamento osmótico.

Por outro lado, observando a figura 9, podemos concluir que a subida inicial entre  $t=0$  e  $t=5$  segundos, demonstra uma pequena difusão inicial de agente para o interior do tecido e que cria uma pressão osmótica sobre a água nos espaços intersticiais do tecido. Esta

pressão osmótica força a água a abandonar os espaços intersticiais do tecido, o que origina uma aproximação dos constituintes sólidos do tecido que se organizam agora num volume menor. Este arranjo da parte sólida do tecido em menor volume diminui a transmissão da radiação óptica devido à criação momentânea de obstáculos no percurso óptico. Esta diminuição na transmissão é observada entre  $t=5$  e  $t=10$  segundos na figura anterior. O agente osmótico passa a difundir-se gradualmente para o interior do tecido para se localizar no espaço entre os constituintes sólidos que foi deixado pela água. Difunde-se para o interior do volume de sólido que anteriormente diminuía a transmissão da radiação óptica. Este processo é rápido inicialmente (entre  $t=10$  e  $t=60$  segundos), mas tende a diminuir quando os espaços intersticiais se encontram quase saturados de agente (entre  $t=60$  e  $t=110$  segundos). A inserção do agente nos espaços intersticiais causa uma maior adaptação de índices de refração entre os constituintes sólidos do tecido (causadores do espalhamento) e os fluidos intersticiais para onde o agente migrou.

Para este intervalo de tempo ( $t \in [0;110]$  segundos), onde ocorrem os fenómenos mais interessantes com a transmitância do tecido, poderemos ainda retirar outro tipo de informação, se observarmos a figura 10:

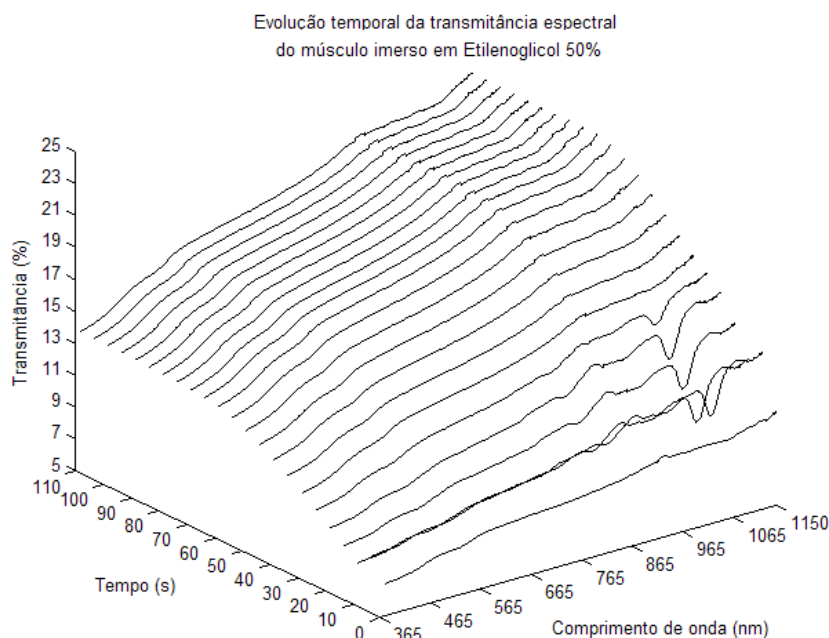


Figura 10: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 50% nos primeiros 110 segundos

Nesta representação verificamos que para as medições realizadas a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos, o espectro altera a sua forma verificando-se a ocorrência de bandas de absorção já no infravermelho. Note-se que na figura 10 foi feita uma representação de como evolui todo o espectro no tempo, o que permite identificar a alteração na forma espectral do espectro de transmitância do tecido. Estas bandas de absorção verificadas nos instantes de medição referidos não têm qualquer explicação senão pela ocorrência de movimento de água no interior do tecido. Se assim é, o processo de medição adoptado permite identificar a desidratação que ocorre no tecido. Este é um assunto que merece interesse para futuros estudos. Iremos discutir este assunto mais em detalhe no capítulo seguinte.

Os parâmetros finais do tecido foram também medidos para comparação com os seus correspondentes em estado natural.

Tabela 14: Parâmetros finais do tecido tratado com Etileno Glicol 50%

<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.14 g	5.66 a 21.8°C	1.3890

Comparando os valores apresentados nas tabelas 13 e 14, podemos calcular as variações ocorridas no tecido em termos destes parâmetros devido ao tratamento. Assim, a massa diminuiu de 0.02 gramas, o pH baixou de 0.54 (desprezando a pequena variação de temperatura entre medições), enquanto que o índice de refração diminuiu de 1.3980 para 1.3890. Esta diminuição do índice de refração é resultado da adaptação de índices de refração que ocorre por difusão do agente para os espaços intersticiais.

Se considerarmos a equação 10, podemos estimar a fracção de agente que se introduziu para o interior do tecido com o tratamento aplicado. Para que esta equação possa descrever correctamente o tratamento aplicado teria que sofrer correcções, conforme já mencionamos no estado da arte. As correcções necessárias contemplam a necessidade de estudos em que se faz a discriminação entre variações devidas ao tratamento osmótico e outras devido a desidratação a partir de medições de índice de refração e de massa ao longo do tempo. Trata-se de um processo complexo de implementar experimentalmente que irá merecer o nosso interesse no futuro. No entanto, a equação 10 permite obter uma estimativa de valores que nos dão uma ideia da ordem de grandeza da fracção de agente que se encontra no interior do tecido após o tratamento. Desta forma, sabendo os valores do índice de refração do tecido natural, do agente

utilizado e do tecido após tratamento conhecemos todos os parâmetros que figuram nessa equação, excepto a fracção em volume do agente que se inseriu no tecido. A equação 10 pode ser tratada para uma forma mais simplista de cálculo. Esta nova representação da equação 10 encontra-se na equação 16:

$$f_{\text{agente}} = \frac{n_{\text{tratado}} - n_{\text{natural}}}{n_{\text{agente}} - n_{\text{natural}}} \quad \text{Equação 16}$$

O valor da fracção em volume do agente que se introduziu no tecido deve ser inferior a 1, conforme já discutimos, para garantir que a soma de fracções de volume do agente, dos constituintes sólidos do tecido e eventualmente de água residual seja sempre igual à unidade. Com esta condição imposta e com os valores conhecidos para os índices de refacção do tecido natural, do Etileno Glicol a 50% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é calculada pela equação 16, resultando o valor de 0.6. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento ainda existe água no interior do tecido. Esta é a estimativa que nos é possível fazer em face dos dados experimentais que dispomos.

Vejamos agora as variações ocorridas a nível histológico que o tratamento criou. Vamos em primeiro lugar comparar os valores de espessura médios calculados entre o tecido natural e o tecido após o tratamento com este agente.



Figura 11: Fotografia do tecido tratado com solução de Etileno Glicol a 50% com ampliação 2x

Para esta fotografia vamos medir a espessura em 10 pontos distintos conforme foi feito para o tecido natural e depois calcular a média para comparação com o valor obtido no

tecido natural. Comparando estes dois valores, obtemos a variação de espessura que o tecido sofreu em média devido ao tratamento. Das 10 medições feitas sobre o tecido tratado, obtivemos os seguintes valores:

Tabela 15: Medições pontuais da espessura do tecido tratado com Etileno Glicol a 50%

<b>Medições pontuais da espessura do tecido tratado</b>									
0.58	0.60	0.59	0.50	0.59	0.50	0.59	0.57	0.55	0.60

O valor médio calculado para a espessura do tecido tratado é:

$$\langle d_{\text{tratado}} \rangle = 0.567 \text{ mm}$$

Verifica-se assim um aumento de espessura de 0.055 mm devido ao tratamento com o Etileno Glicol a 50%.

Vamos agora comparar agora as variações ocorridas para as fibras musculares do tecido desde o seu estado natural para o estado após o tratamento com o Etileno Glicol a 50% em termos de número e distribuição. Para fazermos esta comparação, consideramos as fotografias do tecido natural (figura 7 b)) e do tecido tratado, apresentada na figura abaixo.

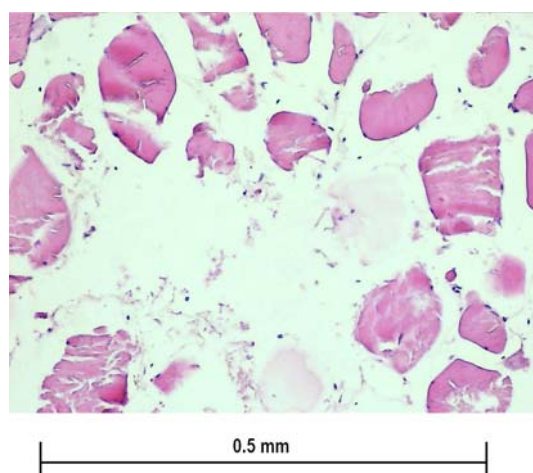


Figura 12: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol a 50% com ampliação 10x

Podemos observar que o tecido tratado apresenta apenas 19 fibras na área da fotografia. Comparando com o número obtido para o tecido natural, verificamos uma diminuição de 6 fibras com o tratamento aplicado. Por outro lado, a distribuição homogênea que existia no tecido natural deixou de existir após o tratamento. No tecido tratado, as fibras encontram-se mais dispersas, existindo grandes espaços entre elas. Estes espaços que

parecem vazios contêm agora o agente que ao difundir-se para o interior, forçou as fibras a se afastarem. Este afastamento das fibras no interior do tecido e criação de espaços consideráveis entre elas está relacionado com o aumento de espessura do tecido, que já identificamos. Por outro lado, é possível que tenha ocorrido também uma compressão da secção recta das fibras forçada pelo agente. Esta variação, não pode ser verificada com precisão pela análise das fotografias dos tecidos pelas dificuldades que já referimos. No entanto, visualmente podemos constatar que as fibras de maior secção recta presentes no tecido natural não aparecem no tecido tratado. Terão elas sido comprimidas transversalmente? É bem possível que sim se fizermos a analogia com as variações descritas na literatura encontradas para outros tipos de tecido fibroso <sup>(1, p:19-20)</sup>. Podemos concluir a caracterização do efeito de transparência para esta solução dizendo que o aumento da transparência óptica do tecido está relacionado com a diminuição da massa e do pH do tecido, assim como com a adaptação de índices de refração no interior do tecido. A diminuição de pH do tecido é imposta pelo processo de desidratação, uma vez que a água apresenta um pH próximo de 7 à temperatura ambiente. A variação do índice de refração global do tecido tem a ver com a difusão do agente para o espaço inter-fibras e consequente adaptação de índices no interior do tecido. Podemos também dizer que o processo de desidratação do tecido leva à aproximação espacial das fibras musculares que por instantes bloqueiam um pouco a passagem da radiação óptica através do tecido. Observamos este efeito durante os primeiros instantes de tratamento na figura 9. Embora a transmitância diminua um pouco antes de atingir o regime de saturação, os valores finais são sempre superiores aos verificados naturalmente no tecido e tendem a manter-se. Isto significa que para reverter o processo, o tecido teria de ser re-hidratado de forma assistida, dado que o estudo foi realizado numa situação *ex-vivo*. O tratamento aplicado ao tecido reduz o número de fibras na área da fotografia e altera a forma como elas se distribuem espacialmente. Verifica-se visualmente também uma diminuição da secção recta das fibras do tecido natural para o tratado.

#### **4.2.2.2 Solução com concentração de 75%**

A metodologia aplicada no estudo com este agente é idêntica à utilizada no estudo do caso anterior. Os valores de pH e de índice de refração para o Etileno Glicol com concentração de 75% são:



Tabela 16: Parâmetros medidos na solução de Etileno Glicol 75%

Parâmetros medidos no agente	
pH	Índice de Refracção
6.66 a 25.1°C	1.4060

O tecido no seu estado natural apresentava os seguintes parâmetros:

Tabela 17: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Etileno Glicol 75%

Parâmetros iniciais do tecido		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.15 g	5.68 a 19.9°C	1.3980

Mediram-se os espectros durante o tratamento osmótico do tecido. Podemos verificar como aumenta o espectro de transmitância desde o estado natural para os diversos instantes de tratamento:

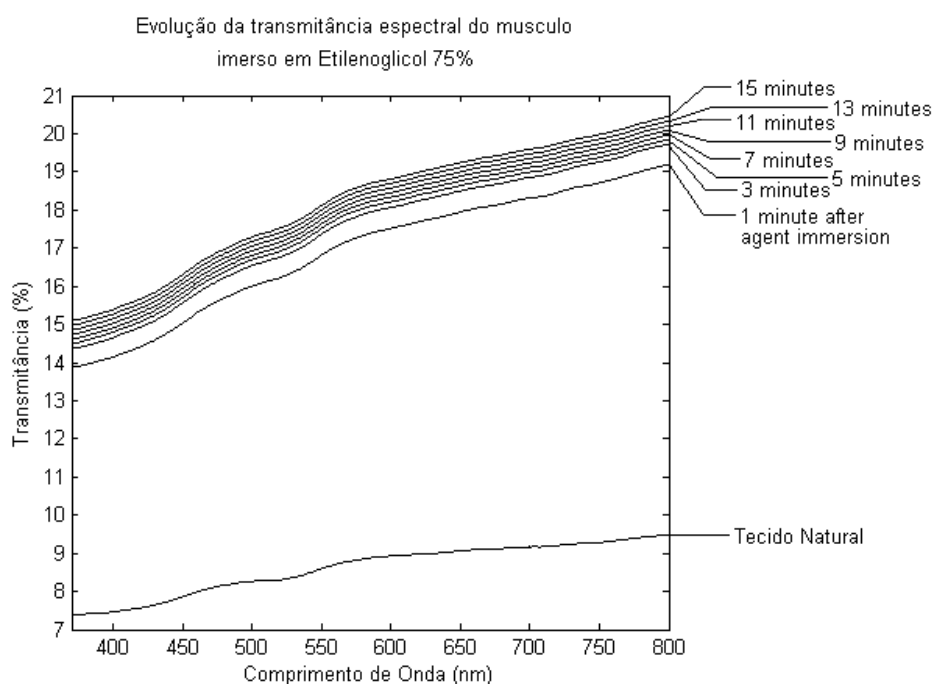


Figura 13: Evolução temporal do espectro de transmitância do tecido devido ao tratamento com Etileno Glicol 75%

Considerando a evolução global da transmitância para os comprimentos de onda escolhidos, obtemos as seguintes curvas para um período de tratamento de 15 minutos:

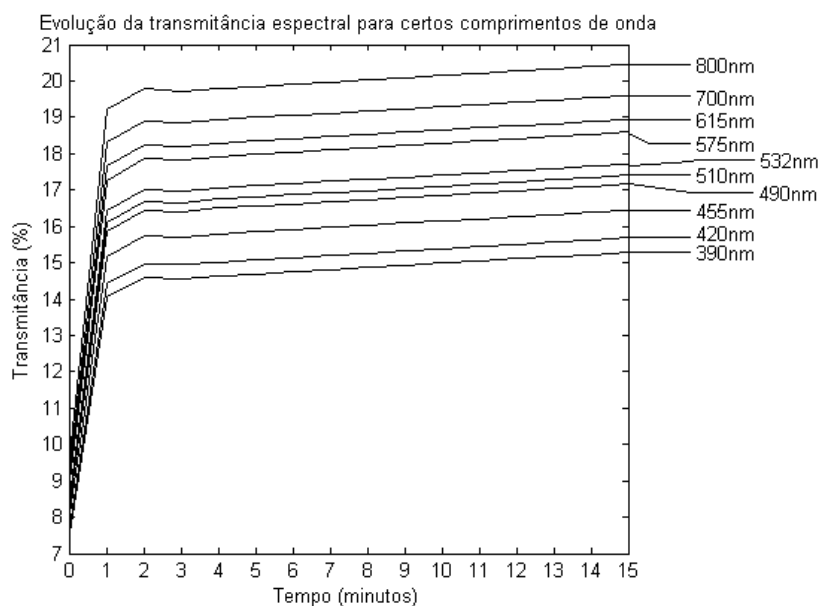


Figura 14: Curvas de evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 75%

Neste caso, verifica-se também uma subida rápida para todas as curvas no primeiro minuto de tratamento osmótico. Entre o primeiro minuto e o segundo a tendência de crescimento das curvas diminui como no caso anterior. Por último, verifica-se uma diminuição muito reduzida entre o segundo e o terceiro minutos de tratamento, começando no 4.º minuto o regime linear, agora com uma tendência ligeiramente crescente. As diferenças verificadas entre o caso anterior e o presente estão certamente relacionadas com a diferença de concentrações dos agentes utilizados. Mais ainda, por esta solução osmótica apresentar uma concentração 25% superior à que foi anteriormente estudada, o tecido aumenta mais a sua transmitância no primeiro minuto. Verifica-se que nos três primeiros minutos de tratamento por imersão do tecido, ocorre um comportamento semelhante nos dois casos até aqui apresentados, embora as grandezas envolvidas sejam diferentes.

Este tecido ao ser tratado com Etileno Glicol a 75%, apresenta também oscilações iniciais, conforme podemos observar na figura seguinte.

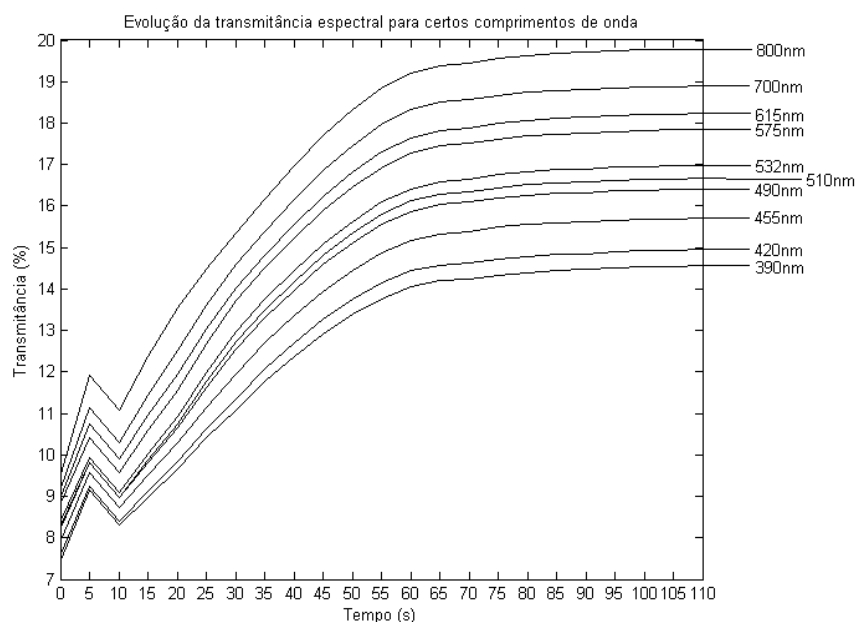


Figura 15: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 75% nos primeiros 110 segundos de tratamento

A explicação para as oscilações que se verificam na figura anterior foi já dada no caso do Etileno Glicol a 50%.

Mais uma vez se verifica a ocorrência de bandas de absorção nos espectros de transmitância medidos a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos de tratamento. Isto demonstra que a variação da concentração do agente não interfere com a ocorrência das bandas de absorção, que indicam para esses instantes de tempo o movimento de água no tecido.

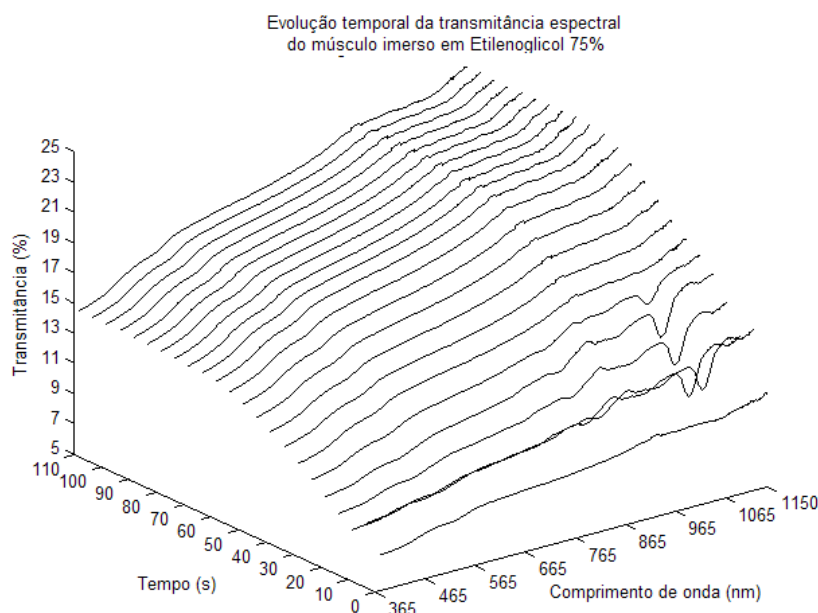


Figura 16: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 75% nos primeiros 110 segundos

No final do tratamento, o tecido apresentava os seguintes valores para os parâmetros considerados:

Tabela 18: Parâmetros finais do tecido tratado com Etileno Glicol 75%

<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.13 g	5.30 a 20.1°C	1.4040

Comparando os valores representados nas tabelas 17 e 18, podemos avaliar as variações ocorridas devido ao tratamento com este agente. A massa diminuiu de 0.02 gramas, o pH baixou de 0.38 (desprezando a pequena variação de temperatura entre medições), enquanto que o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4040. Este aumento do índice de refração deve-se à diferença de concentrações entre as soluções e ao maior poder de penetração do Etileno a 75%.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, do Etileno Glicol a 75% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é calculada pela equação 16, resultando o valor de 0.75. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o tecido deve estar praticamente desidratado na totalidade. Esta é a estimativa que nos é possível fazer em face dos dados experimentais que dispomos. Por outro lado, a fracção de agente que estimamos ter-se difundido para o interior do tecido é superior no caso do Etileno Glicol 75% comparando com o caso do Etileno Glicol a 50%, o que indica maior poder de tratamento para esta solução.

Para avaliarmos a eventual variação de espessura no tecido tratado, necessitamos de medir alguns valores na fotografia do tecido.

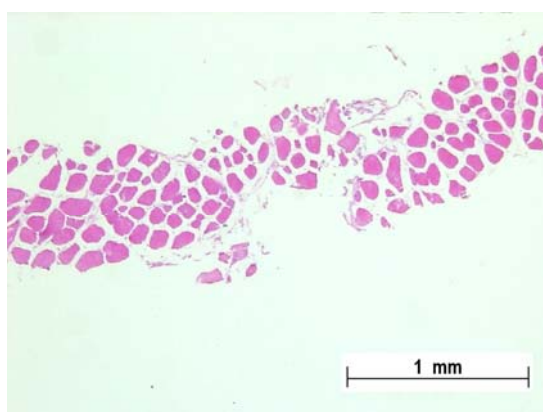


Figura 17: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 75% com ampliação de 2x

Os valores medidos nesta fotografia foram os seguintes:

Tabela 19: Medições pontuais da espessura do tecido tratado

<b>Medições pontuais da espessura do tecido tratado</b>									
0.70	0.74	0.70	0.74	0.5	0.45	0.75	0.65	0.65	0.70

O valor médio calculado para a espessura do tecido após o tratamento é:

$$\langle d_{\text{tratado}} \rangle = 0.658 \text{ mm}$$

Comparando com o valor calculado para o tecido natural (apresentado anteriormente), verificamos um aumento de espessura média de 0.146 mm devido ao tratamento com o Etileno Glicol a 75%.

Analisando agora a fotografia obtida para este tecido com ampliação de 10x, podemos concluir por comparação com o estado natural do tecido que as fibras musculares se encontram mais dispersas pela área da fotografia e apresentam um diâmetro global aparente inferior após o tratamento. Contamos também neste caso 19 fibras presentes na fotografia, considerando a mesma área.

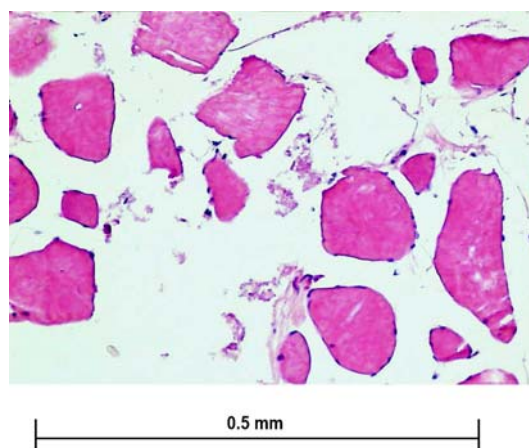


Figura 18: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 75% com ampliação de 10x

Embora tenhamos detectado diferenças significativas na evolução da transmitância entre os dois casos estudados até aqui, não foi possível detectar a nível histológico grandes diferenças, excepto um maior aumento de espessura neste caso.

Reunindo toda a informação adquirida neste estudo, podemos caracterizar o efeito de transparência criado pelo Etileno Glicol numa concentração de 75%. Verificamos que o aumento da transmitância ao longo do tempo causado por este agente é superior ao que

foi verificado para a solução de 50%. No regime de saturação, a tendência é agora crescente. Verifica-se a mesma diminuição de massa do tecido e uma diminuição de pH ligeiramente inferior ao caso anterior. Por outro lado, o índice de refração global do tecido aumenta para o tecido tratado com Etileno Glicol a 75%, ao contrário do que se verificava para o Etileno Glicol a 50%. Esta diferença poderá indicar uma maior adaptação de índices de refração no interior do tecido. Verifica-se também um maior aumento da espessura média do tecido e a mesma redução do número de fibras que foi observada no caso anterior por comparação com o tecido natural.

#### 4.2.2.3 Solução com concentração de 87%

Para finalizarmos o estudo dos efeitos criados por soluções de Etileno Glicol, utilizamos uma terceira solução aquosa deste produto com uma concentração de 87%. Empregando os mesmos métodos de estudo começamos por registar os valores de pH e de Índice de refração do agente utilizado.

Tabela 20: Parâmetros medidos na solução de Etileno Glicol 87%

<b>Parâmetros medidos no agente</b>	
<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
7.20 a 25.1°C	1.4140

Os parâmetros registados no tecido antes do tratamento foram:

Tabela 21: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Etileno Glicol 87%

<b>Parâmetros iniciais do tecido</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.18 g	5.64 a 19.5°C	1.3980

Mediram-se os espectros durante o tratamento osmótico do tecido, verificando-se que ao fim de 1 minuto de tratamento, a transmitância duplicou no tecido:

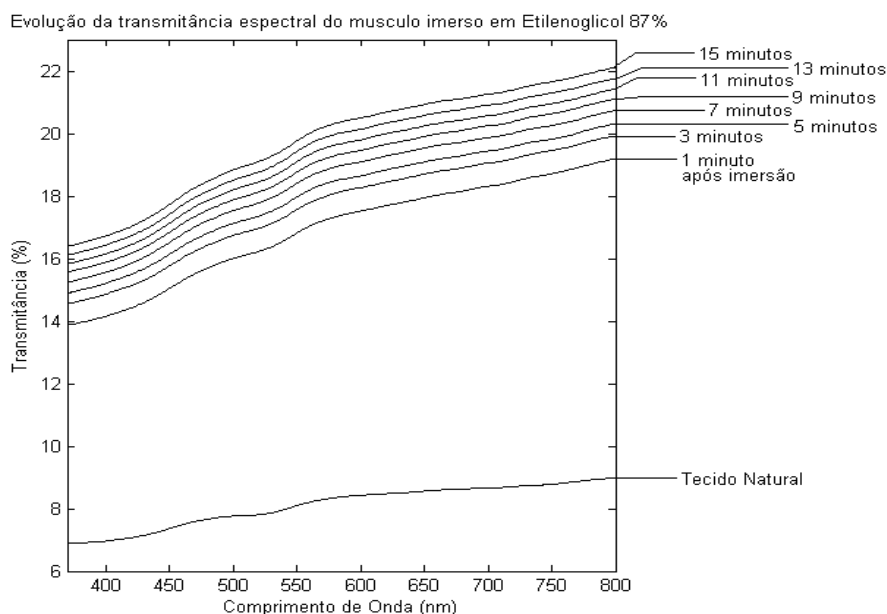


Figura 19: Evolução temporal do espectro de transmitância do tecido devido ao tratamento com Etileno Glicol 87%

Escolhendo novamente os valores espectrais para os comprimentos de onda adoptados para as representações gráficas, obtemos a evolução temporal da transmitância durante os 15 minutos de tratamento:

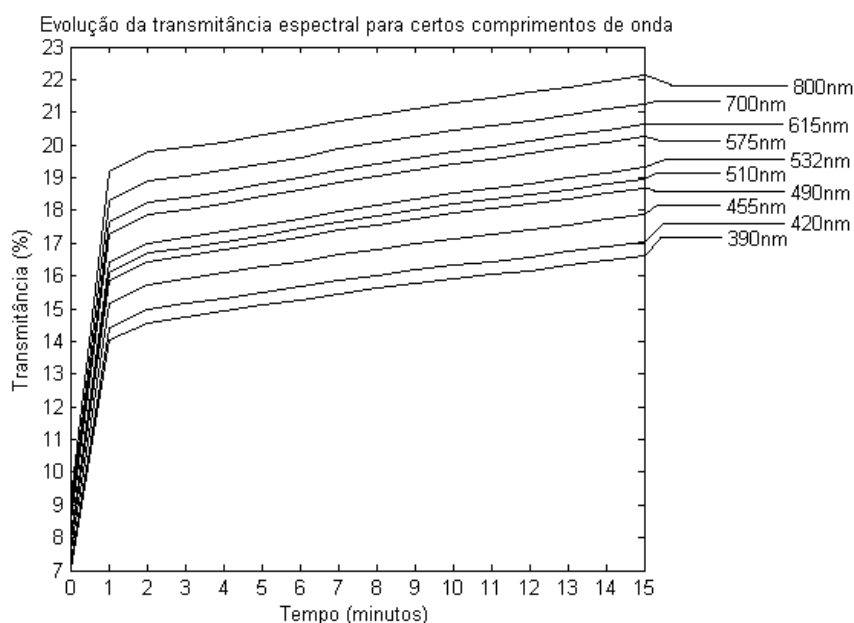


Figura 20: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 87%

Como podemos observar, a transmitância duplica logo após o primeiro minuto de tratamento. A figura anterior é muito semelhante à correspondente para o caso do Etileno Glicol a 75% (figura 14). No entanto o regime linear apresenta um crescimento

superior neste caso, tendendo a alinhar-se com a tendência observada entre o primeiro e o segundo minutos de tratamento.

Na figura 21, podemos observar as oscilações iniciais pelas quais passa a transmitância do tecido:

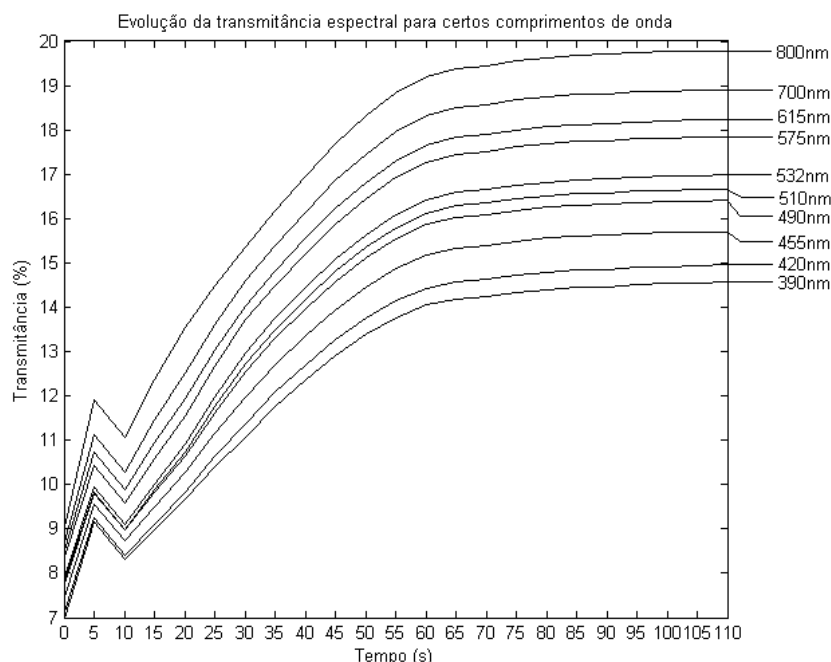


Figura 21: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 87% nos primeiros 110 segundos de tratamento

A explicação para este tipo de oscilações iniciais foi já dada para o caso do Etileno Glicol a 50%. Conforme podemos verificar, o decréscimo entre os 5 e os 10 segundos é menor do que nos casos anteriores. Isto significa que os constituintes sólidos do tecido não se compactam tanto como nos casos anteriores para bloquear a passagem da radiação óptica. Tal facto está relacionado com o maior poder de penetração deste agente devido à sua maior concentração elevada.

À semelhança dos casos anteriores, verifica-se também a ocorrência de bandas de absorção no infravermelho nos instantes de medição 5, 10, 15, 20 e 25, o que pode traduzir o movimento de água dentro do tecido no processo de desidratação. Na figura 22, encontra-se representada a evolução do espectro de transmitância durante os primeiros 110 segundos onde se podem observar estas bandas de absorção.



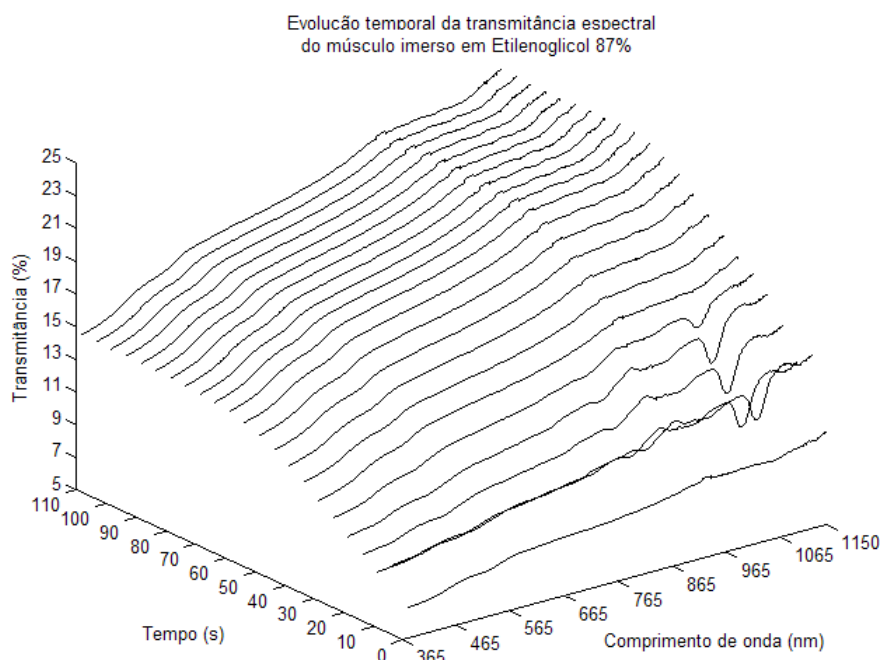


Figura 22: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Etileno Glicol 87% nos primeiros 110 segundos

Depois de avaliado o estudo óptico, mediram-se os parâmetros finais do tecido para determinar as variações ocorridas devido ao tratamento:

Tabela 22: Parâmetros finais do tecido tratado com Etileno Glicol 87%

Massa	pH	Índice de Refracção
0.11 g	5.55 a 21.3°C	1.4105

Comparando os valores representados nas tabelas 21 e 22, podemos avaliar as variações ocorridas devido ao tratamento com este agente. A massa diminuiu de 0.07 gramas, o pH baixou de 0.09 (desprezando a pequena variação de temperatura entre medições), enquanto que o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4105. Verifica-se neste caso uma maior diminuição de massa do tecido e um maior aumento do seu índice de refração. O valor do pH do tecido mantém-se praticamente constante neste caso.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, do Etileno Glicol a 87% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.78. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o tecido encontra-se totalmente desidratado. A superioridade deste valor relativamente ao seu correspondente para a água no estado natural está

relacionada com o aumento de volume do tecido e/ou diminuição do volume dos constituintes sólidos.

Vamos agora comparar as espessuras médias do tecido entre o estado natural e após tratamento. Considerando o corte histológico do tecido após tratamento representado na figura 23, fizemos algumas medições da sua espessura. Estes resultados encontram-se representados na tabela 23.



Figura 23: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 87% com ampliação de 2x

Os valores de espessura pontualmente medidos nesta fotografia foram os seguintes:

Tabela 23: Medições pontuais da espessura do tecido tratado

Medições pontuais da espessura do tecido tratado									
0.65	0.5	0.48	0.55	0.45	0.35	0.40	0.5	0.65	0.7

O valor médio calculado para a espessura do tecido após o tratamento é:

$$\langle d_{\text{tratado}} \rangle = 0.523 \text{ mm}$$

Comparando com o valor calculado para o tecido natural (tratado inicialmente), verificamos um aumento de espessura média de 0.011 mm devido ao tratamento com o Etileno Glicol a 87%. Este aumento é menor do que os verificados para as soluções de 50% e 75% do Etileno Glicol. Isto poderá significar que neste caso a desidratação do tecido e a difusão do agente para o interior tenham ocorrido em proporções idênticas. Queremos com isto dizer que a desidratação foi total ou quase total e que o agente ocupou todo o volume deixado pela água e um pouco mais. Assim sendo, o menor

aumento de espessura vem confirmar uma boa estimativa para a fracção de agente no interior do tecido após o tratamento aplicado.

Comparando a fotografia da figura 24 com a sua correspondente para o tecido natural (figura 7 b)), podemos constatar uma distribuição mais dispersa das fibras no tecido tratado, assim como as fibras neste caso apresentam diâmetros menores. Podemos neste caso contar 23 fibras musculares na fotografia. Embora, este número seja apenas inferior em duas unidades ao verificado para o tecido natural, temos que contar com a diminuição do diâmetro das fibras e também com a sua nova distribuição mais dispersa, que podemos avaliar visualmente.

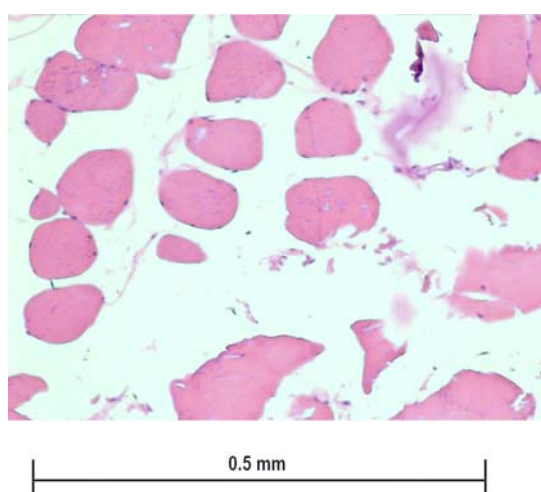


Figura 24: Fotografia do tecido tratado com Etileno Glicol 87% com ampliação de 10x

Verifica-se para esta solução osmótica a criação de um efeito de transparência de maior magnitude, embora pela análise das fotografias em corte, seja difícil identificar grandes diferenças entre os diferentes tecidos tratados.

Finalmente vamos caracterizar o efeito de transparência criado pelo Etileno Glicol 87% considerando todas as variações ocorridas. Desta forma, a evolução da transmitância medida opticamente é superior aos dois casos anteriormente estudados. O regime de saturação para este caso apresenta uma tendência crescente superior ao caso do Etileno Glicol a 75%. Este comportamento encontra-se relacionado com a maior diminuição de massa verificada e o maior aumento de índice de refração. A espessura média para este tecido aumenta menos do que nos casos anteriormente apresentados. A explicação para este facto foi já apresentada. A diminuição do número de fibras musculares no interior do tecido tratado é também menor se bem que se encontram mais dispersas do que no caso do tecido natural e o diâmetro médio visualmente observado é o menor de todos os casos estudados.

Podemos concluir o estudo dos tratamentos com soluções de Etileno Glicol, considerando a existência de uma relação de dependência entre a concentração do agente aplicado e o efeito de transparência criado no tecido. O efeito será tanto maior, quanto maior for a concentração do agente aplicado. Um estudo mais detalhado deste comportamento merecerá o nosso interesse em futuros estudos de forma a podermos caracterizar esta relação de modo mais preciso.

### 4.2.3 Glicerina

Passamos a estudar os efeitos de transparência criados por soluções de Glicerina. Para este agente adotamos também soluções com as concentrações de 50%, 75% e 87%, para podermos comparar entre os casos estudados com as soluções de Etileno Glicol. A metodologia adotada experimentalmente foi a mesma.

#### 4.2.3.1 Solução com concentração de 50%

A Glicerina numa concentração de 50% apresenta os seguintes valores de pH e índice de refração:

Tabela 24: Parâmetros medidos na solução de Glicerina 50%

<b>Parâmetros medidos no agente</b>	
<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
6.54 a 24.4°C	1.4060

Os parâmetros registados no tecido antes do tratamento foram:

Tabela 25: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Glicerina 50%

<b>Parâmetros iniciais do tecido</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.13 g	6.16 a 23.4°C	1.3980

Mediram-se os espectros durante o tratamento osmótico do tecido. A evolução global da transmitância para certos comprimentos de onda ao longo do espectro encontra-se representada na figura seguinte:

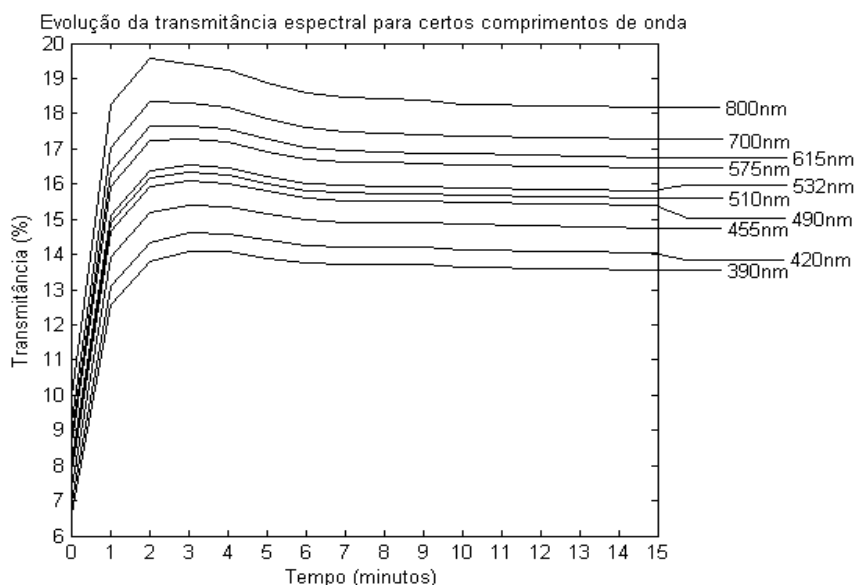


Figura 25: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50%

Verifica-se um comportamento semelhante ao verificado para o Etileno Glicol na mesma concentração: Aumento bastante rápido da transmitância no primeiro minuto, diminuição ligeira dessa tendência crescente até ao 2 minuto, com posterior decréscimo até aos 6 a 7 minutos de tratamento para entrar a partir daí em regime de saturação.

Também neste caso se verifica a ocorrência das oscilações iniciais, conforme podemos confirmar na figura 26:

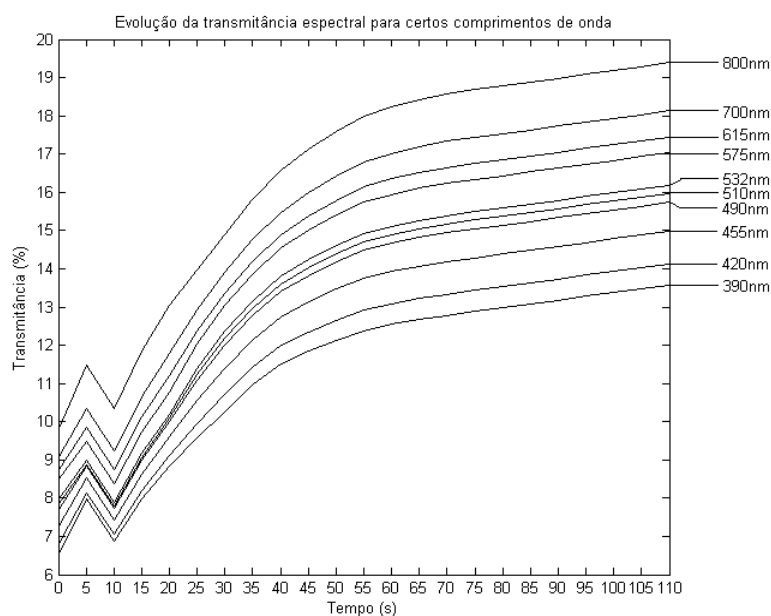


Figura 26: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50% nos primeiros 10 segundos de tratamento

As oscilações iniciais verificadas com a adição de Glicerina a 50% ao tecido foram já explicadas para o caso do Etileno Glicol.

Note-se que para todos os comprimentos de onda representados nas duas figuras anteriores, o comportamento das curvas é o mesmo. Embora, os níveis de transmitância sejam diferentes para os diferentes tratamentos aplicados, verificamos também neste caso a ocorrência das bandas de absorção no infravermelho.

Conforme podemos verificar na figura 27, a ocorrência destas bandas nas medições iniciais é evidente. É importante verificar que o espectro mantém a sua forma em todas as medições ao longo do tempo, excepto para medições feitas a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos de tratamento.

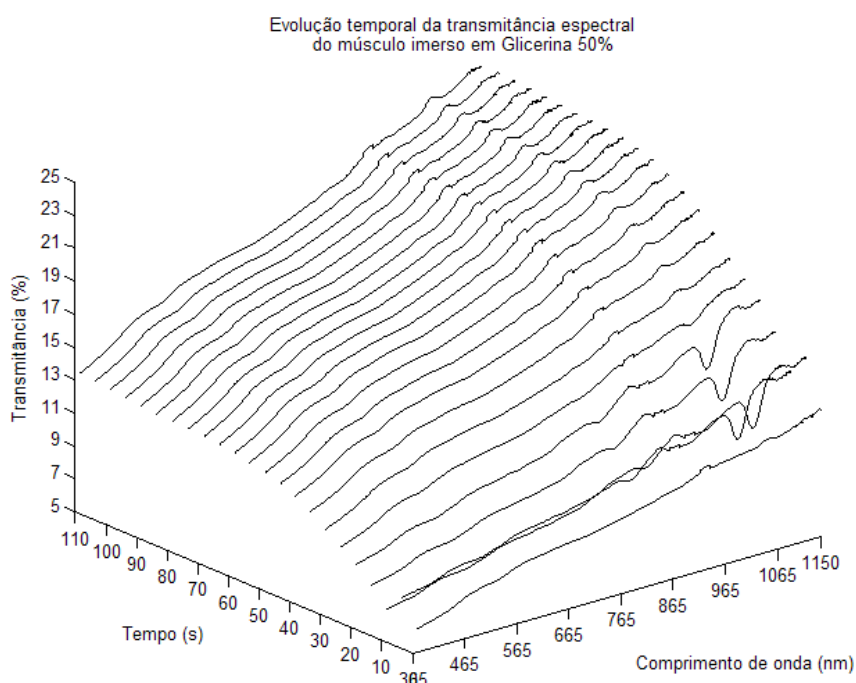


Figura 27: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 50% nos primeiros 110 segundos

No final do estudo óptico registaram-se os parâmetros finais do tecido tratado:

Tabela 26: Parâmetros finais do tecido tratado com Glicerina 50%

Massa	pH	Índice de Refracção
0.10 g	5.95 a 24°C	1.4030

Comparando os valores representados nas tabelas 25 e 26, verificamos que a massa do tecido diminuiu de 0.03 gramas, o pH diminuiu de 0.21 (desprezando a pequena

variação de temperatura entre medições), enquanto que o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4030.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, da Glicerina a 50% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.63. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o tecido deve conter ainda uma percentagem de água considerável no seu interior.

Vamos agora comparar as espessuras médias do tecido entre o estado natural e após tratamento. Considerando o corte histológico do tecido após tratamento representado na figura 28, fizemos algumas medições da sua espessura. Estes resultados encontram-se representados na tabela 27.

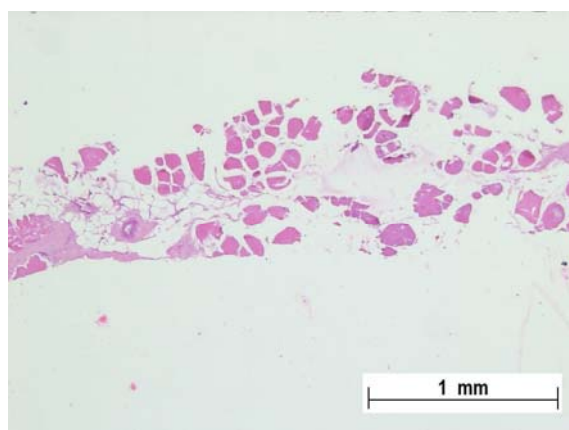


Figura 28: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 50% com ampliação de 2x

Os valores medidos nesta fotografia foram os seguintes:

Tabela 27: Medições pontuais da espessura do tecido tratado

Medições pontuais da espessura do tecido tratado									
0.64	0.6	0.56	0.64	0.65	0.7	0.75	0.7	0.8	0.8

O valor médio calculado para a espessura do tecido após o tratamento é:

$$\langle d_{\text{tratado}} \rangle = 0.684 \text{ mm}$$

Verifica-se que do tecido natural para o tecido tratado há um aumento de espessura média de 0.172 mm devido ao tratamento com a Glicerina a 50%.

Tal como nos casos estudados para o Etileno Glicol, a distribuição interna das fibras musculares sofre alterações. Se compararmos a fotografia do tecido tratado com a Glicerina a 50% representada na figura 29 com a fotografia do tecido natural representada na figura 7 b), podemos verificar uma distribuição de fibras menos concentrada para o tecido tratado. O diâmetro médio das fibras também diminui com o tratamento aplicado com a Glicerina a 50%, conforme podemos constatar visualmente. Relativamente ao número de fibras, verificamos neste caso a existência de apenas 14, o que indica que a Glicerina força a distribuição das fibras no tecido a se dispersar fortemente.

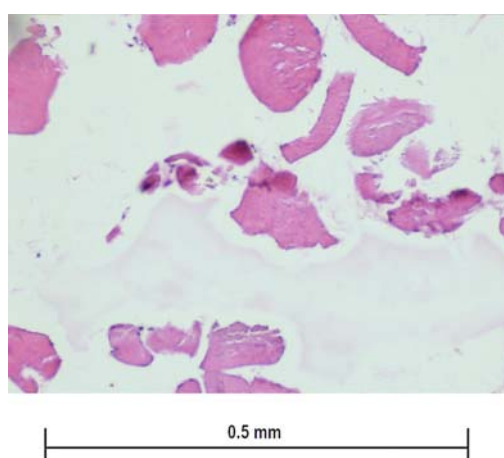


Figura 29: Fotografia do tecido tratado com Glicerina a 50% com ampliação de 10x

Podemos caracterizar o efeito de transparência criado pela Glicerina em solução de 50%, por reunião da informação obtida neste estudo. Assim, verificamos o aumento da transmitância por adição do agente. Este comportamento está relacionado com a desidratação do tecido identificada pela diminuição de massa e de pH verificados experimentalmente, assim como com o aumento de índice de refração devido à difusão do agente para o interior do tecido e consequente adaptação de índices de refração no tecido. Verifica-se também a ocorrência de oscilações na transmitância nos instantes iniciais de tratamento devido à maior compactação temporária das fibras musculares, que durante esse pequeno período de tempo funcionam como anteparo e produzem maior espalhamento da radiação óptica. O comportamento temporal da transmitância é em tudo semelhante ao verificado e já discutido para o Etileno Glicol na mesma concentração. Embora o regime de saturação apresente uma tendência ligeiramente decrescente, os níveis finais da transmitância encontram-se muito acima dos níveis medidos para o tecido natural. Ocorrem também um aumento na espessura média do



tecido e uma redução do número de fibras por área da secção recta do tecido. Os diâmetros médios destas fibras são também reduzidos devido à pressão causada pelo agente já no espaço intersticial.

Comparando com o Etileno Glicol na mesma concentração, verificamos variações no mesmo sentido para a maioria dos parâmetros, embora a grandeza das variações para este caso seja mais forte, o que indica um efeito de transparência temporário de grandeza superior para a Glicerina a 50%. Lembremos que no caso do Etileno Glicol, a variação do índice de refração foi negativa, ao contrário do que se verifica para a Glicerina a 50%. A diminuição de pH para este caso é uma excepção, pois é um pouco inferior à variação medida para o tecido tratado com o Etileno Glicol. Tal deve-se a que o Etileno Glicol a 50% apresenta um pH inferior ao medido para a Glicerina na mesma concentração.

#### 4.2.3.2 Solução com concentração de 75%

A solução aquosa de Glicerina com uma concentração de 75% apresenta os seguintes valores de pH e índice de refração:

Tabela 28: Parâmetros medidos na solução de Glicerina 75%

<b>Parâmetros medidos no agente</b>	
<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
6.83 a 24.5°C	1.4145

Os parâmetros registados no tecido antes do tratamento foram:

Tabela 29: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Glicerina 75%

<b>Parâmetros iniciais do tecido</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.12 g	6.27 a 21.2°C	1.3980

Mediram-se os espectros durante o tratamento osmótico do tecido. A evolução global da transmitância para certos comprimentos de onda ao longo do espectro encontra-se representada na figura seguinte:

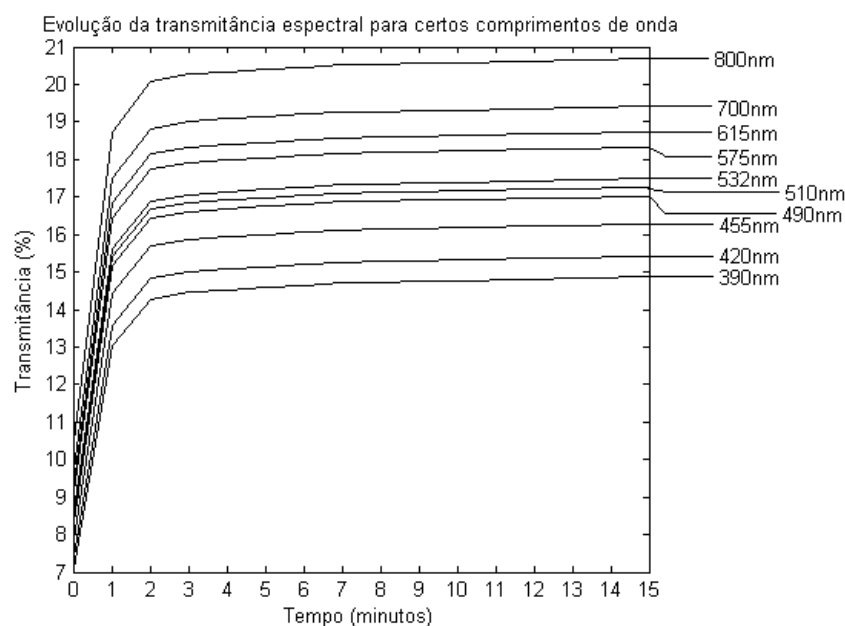


Figura 30: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 75%

Podemos verificar pela figura 30, que a transmitância aumenta rapidamente no primeiro minuto de tratamento à semelhança do que já foi descrito para as soluções estudadas. Se compararmos este efeito com o que foi criado com a solução de Glicerina a 50%, verificamos que para além de ter desaparecido a inversão na tendência crescente após o 2º minuto de tratamento, o aumento da transmitância é maior neste caso, tal como se verificou entre os casos do Etileno Glicol nas concentrações de 50% e 75%. Esta diferença de comportamento após os primeiros minutos demonstra que o agente continua a difundir-se para o interior do tecido, agora em menor proporção. Esta difusão apresenta um regime linear crescente em função do tempo, conforme podemos verificar pelas curvas da figura 30, após os 3 minutos de tratamento.

Os valores da transmitância representados na figura anterior são superiores aos verificados para a situação análoga do Etileno Glicol 75%.

Tal como no caso da Glicerina a 50% e das três soluções de Etileno Glicol, verifica-se a ocorrência de oscilações iniciais na transmitância do tecido devido ao tratamento:

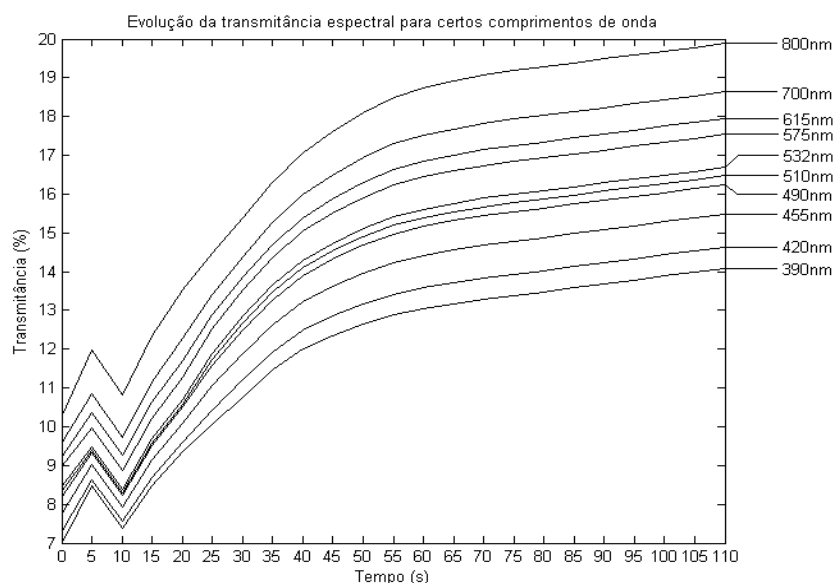


Figura 31: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 75% nos primeiros 100 segundos de tratamento

As oscilações iniciais verificadas neste caso, são semelhantes às das outras soluções já estudadas e foram explicadas no caso do Etileno Glicol a 50%.

Também para este caso se verificam as bandas de absorção nos espectros medidos a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos do tratamento.

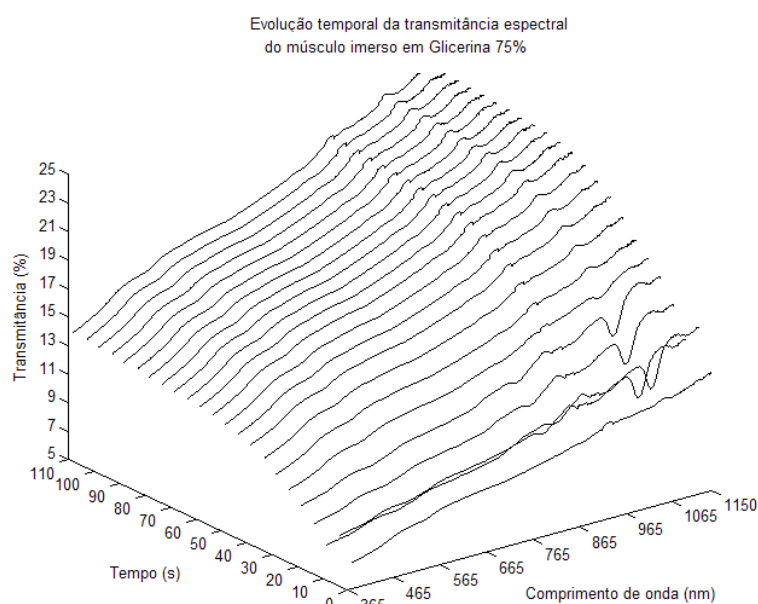


Figura 32: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 75% nos primeiros 110 segundos

Após conclusão do estudo óptico, registamos os parâmetros finais do tecido, para quantificar as variações ocorridas devido ao tratamento:

Tabela 30: Parâmetros finais do tecido tratado com Glicerina 75%

<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.09 g	6.09 a 22.2°C	1.4110

Por comparação entre os valores iniciais e finais dos parâmetros, verificamos uma diminuição de massa de 0.03 gramas, o pH diminuiu de 0.18 (desprezando a pequena variação de temperatura entre medições), enquanto que o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4110.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, da Glicerina a 75% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.79. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento se inseriu uma elevada quantidade de agente que ocupa mais volume do que a água que inicialmente se encontrava no tecido natural. Este facto implica um aumento de volume do tecido e/ou a diminuição volumétrica dos constituintes sólidos.

Vamos agora comparar as espessuras médias do tecido entre o estado natural e após tratamento. Considerando o corte histológico do tecido após tratamento representado na figura 33, fizemos algumas medições da sua espessura, que se encontram na tabela 31.



Figura 33: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 75% com ampliação de 2x

Os valores medidos nesta fotografia foram os seguintes:

Tabela 31: Medições pontuais da espessura do tecido tratado

<b>Medições pontuais da espessura no tecido tratado</b>									
0.75	0.78	0.75	0.73	0.75	0.70	0.70	0.65	0.65	0.70

O valor médio calculado para a espessura do tecido após o tratamento é:

$$\langle d_{\text{tratado}} \rangle = 0.716 \text{ mm}$$

Verifica-se que do tecido natural para o tecido tratado há um aumento de espessura média de 0.204 mm devido ao tratamento com a Glicerina a 75%.

Neste caso, a distribuição interna das fibras musculares sofre também alterações. Se compararmos a fotografia do tecido tratado com a Glicerina a 75% representada na figura 34 com a fotografia do tecido natural representada na figura 7 b), podemos verificar que o tecido tratado apresenta uma distribuição de fibras menos concentrada. O diâmetro médio das fibras também diminui com o tratamento aplicado com a Glicerina a 75%, conforme podemos constatar visualmente.

Relativamente ao número de fibras, verificamos neste caso a existência de apenas 16, o que indica que a Glicerina se introduziu fortemente para o espaço entre as fibras, forçando-as a se dispersarem.

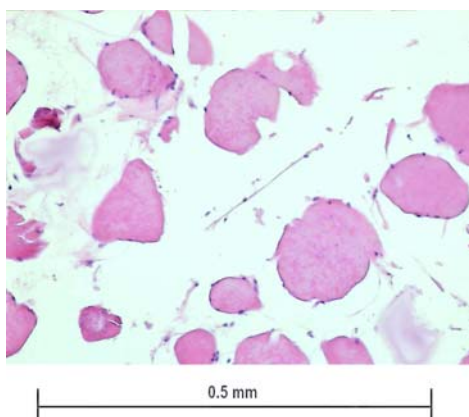


Figura 34: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 75% com ampliação 10x

Caracterizamos o efeito de transparência criado pela Glicerina em solução de 75% reunindo toda a informação obtida neste estudo. Assim, verificamos o aumento da transmitância por adição do agente. Visto que a concentração deste agente é superior à do agente utilizado no caso anterior, verificamos uma mudança de comportamento na evolução temporal da transmitância, tal como tinha acontecido do Etileno Glicol a 50% para o Etileno Glicol a 75%. Também devido a este aumento na concentração do último caso apresentado para o presente, verificamos uma maior diminuição de massa e de pH. O maior aumento de índice de refração relaciona-se com uma maior presença de agente neste caso relativamente ao caso da Glicerina a 50% e à consequente adaptação

de índices de refração que ocorre de forma mais forte. Note-se também que o índice de refração da Glicerina a 75% é superior ao da Glicerina a 50%. A ocorrência de oscilações na transmitância nos instantes iniciais de tratamento verifica-se pelas mesmas razões discutidas anteriormente. O comportamento temporal da transmitância é em tudo semelhante ao verificado e já discutido para o Etileno Glicol na mesma concentração, embora apresente níveis ligeiramente superiores no presente caso. Ocorreu também um aumento na espessura média do tecido e uma redução do número de fibras por área da secção recta do tecido. Os diâmetros médios destas fibras são também reduzidos devido à pressão causada pelo agente já no espaço intersticial.

Comparando com o Etileno Glicol na mesma concentração, verificamos variações no mesmo sentido para todos os parâmetros, embora a grandeza das variações para este caso seja mais forte, à excepção do pH que diminui menos devido ao valor superior de pH do agente utilizado neste caso. Isto indica um efeito de transparência temporário de grandeza superior para a Glicerina a 75%. Desta forma, tal como verificado para o caso do Etileno Glicol, o aumento de concentração de 50% para 75% proporciona a criação de um efeito de transparência de maior magnitude.

#### 4.2.3.3 Solução com concentração de 87%

A solução aquosa de Glicerina com uma concentração de 87% apresenta os seguintes valores de pH e índice de refração:

Tabela 32: Parâmetros medidos na solução de Glicerina 87%

Parâmetros medidos no agente	
pH	Índice de Refracção
7.11 a 24.6°C	1.4515

Os parâmetros registados no tecido antes do tratamento foram:

Tabela 33: Parâmetros iniciais do tecido a tratar com Glicerina 87%

Parâmetros iniciais do tecido		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.14 g	6.22 a 22.6°C	1.3980

O espectro de transmitância aumenta devido ao tratamento com a Glicerina a 87%:

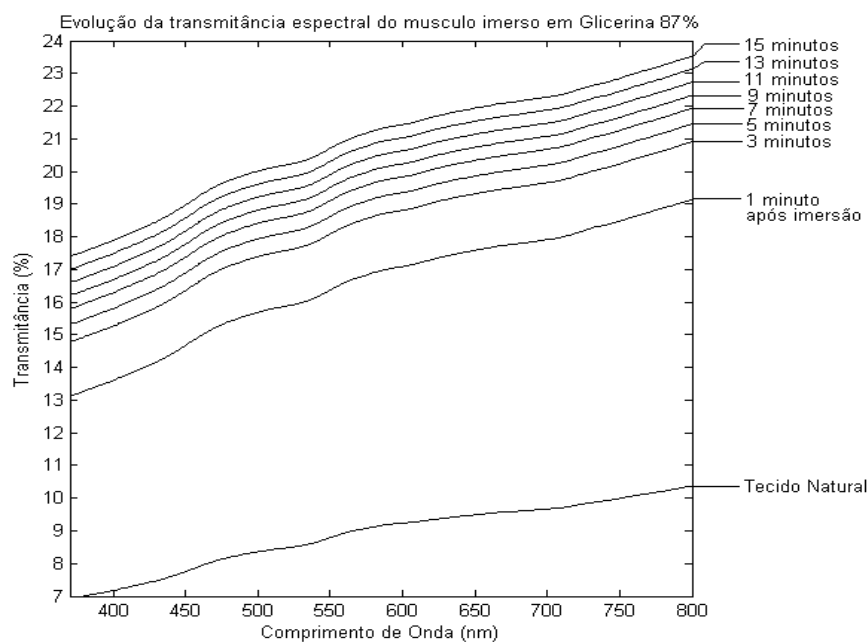


Figura 35: Evolução temporal do espectro de transmitância do tecido devido ao tratamento com Glicerina 87%

A evolução global da transmitância para certos comprimentos de onda ao longo do espectro encontra-se representada na figura seguinte:

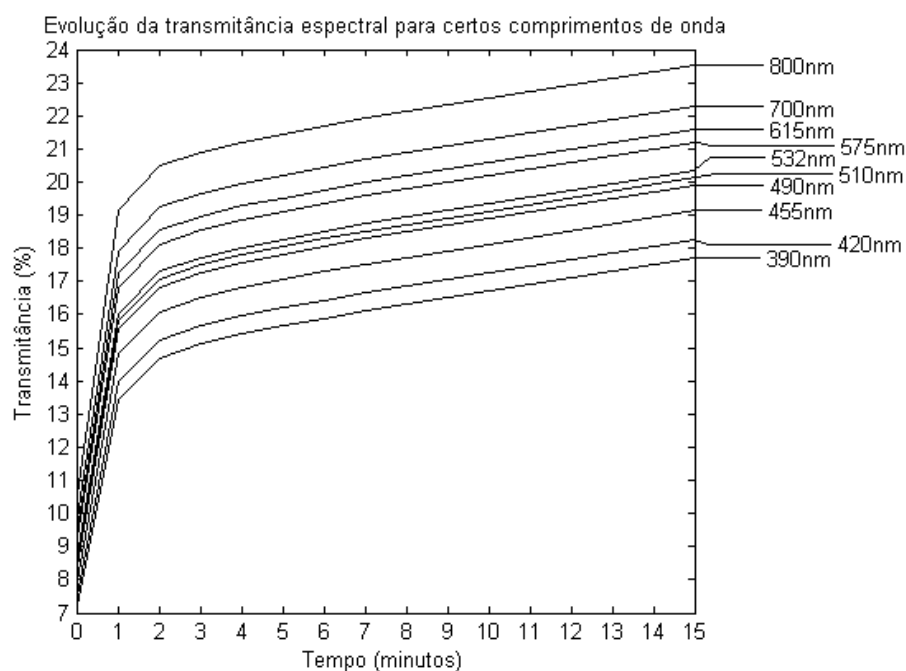


Figura 36: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 87%

Verifica-se neste caso, um aumento da transmitância bastante elevado. Embora no primeiro minuto, a evolução seja semelhante aos restantes casos, não ocorre qualquer diminuição na transmitância durante todo o período de tratamento e o regime linear apresenta um crescimento superior ao verificado para a Glicerina a 75%. A elevada concentração da solução de Glicerina a 87%, proporciona a continuidade de difusão do agente para o interior do tecido após a entrada no regime linear.

Também neste caso se verificam as oscilações iniciais. Podemos verificar pela figura 37, que o decréscimo na transmitância entre os 5 e os 10 segundos é de menor proporção se compararmos com as oscilações verificadas para as outras soluções de Glicerina, anteriormente apresentadas. Tal diminuição na proporção das oscilações verificadas está relacionada com a elevada concentração do agente neste caso, que mantém uma forte pressão osmótica sobre o interior do tecido constantemente.

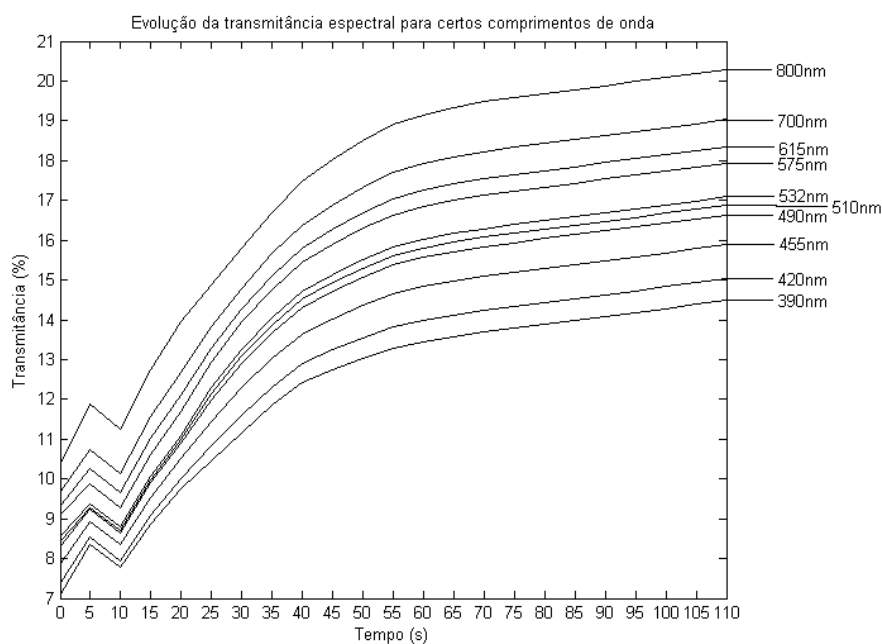


Figura 37: Evolução temporal da transmitância do tecido imerso em Glicerina 87% nos primeiros 110 segundos de tratamento

Para além de se verificarem estas oscilações iniciais, que já explicamos no caso do Etileno Glicol a 50%, a transmitância do tecido continua a apresentar para este caso as bandas de absorção no infravermelho, conforme podemos verificar na figura seguinte:



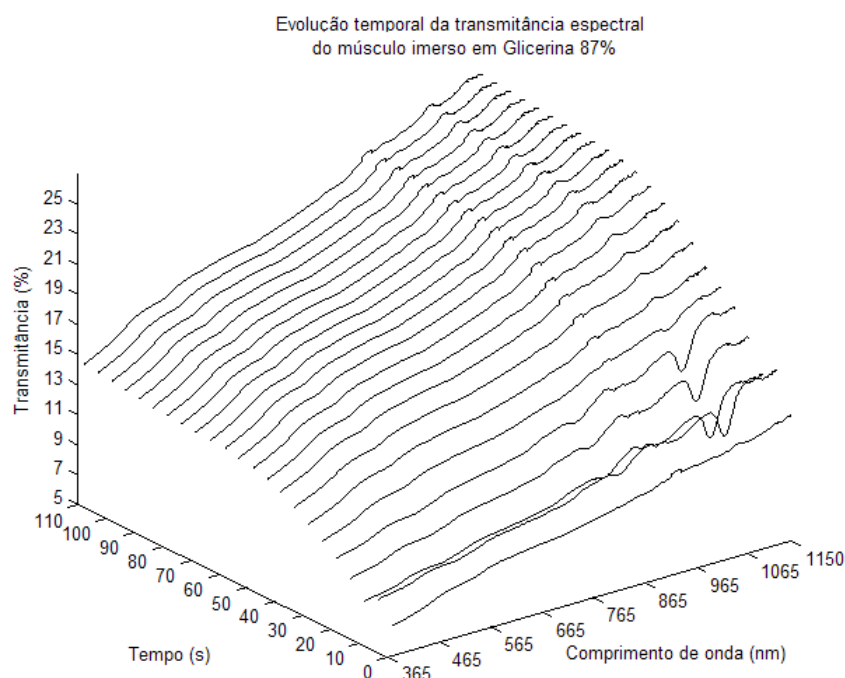


Figura 38: Evolução do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 87% nos primeiros 110 segundos

As bandas de absorção ocorrem para os mesmos instantes de tempo que foram apresentados nas soluções anteriores. No final do estudo óptico foram registados os parâmetros finais do tecido.

Tabela 34: Parâmetros finais do tecido tratado com Glicerina 87%

Massa	pH	Índice de Refracção
0.10 g	6.11 a 21.8°C	1.4420

Por comparação entre os valores iniciais e finais dos parâmetros, verificamos uma diminuição de massa de 0.04 gramas, o pH diminuiu 0.11 (desprezando a pequena variação de temperatura entre medições), enquanto que o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4420.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, da Glicerina a 87% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.82. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o agente ocupa uma fracção em volume superior à que a água ocupava inicialmente no tecido natural. Este facto implica o aumento de volume do tecido e/ou a diminuição do volume dos constituintes sólidos no interior do tecido.

Vamos agora comparar as espessuras médias do tecido entre o estado natural e após tratamento. Considerando o corte histológico do tecido após tratamento representado na figura 39, fizemos algumas medições da sua espessura. Estes resultados encontram-se representados na tabela 35.

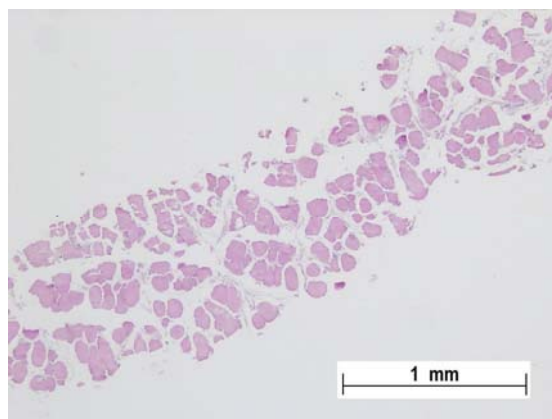


Figura 39: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 87% com ampliação de 2x

Os valores medidos nesta fotografia foram os seguintes:

Tabela 35: Medições pontuais da espessura do tecido tratado

Medições pontuais da espessura									
0.86	0.75	0.7	0.75	0.6	0.95	0.92	0.96	0.80	0.80

O valor médio calculado para a espessura do tecido após o tratamento é:

$$\langle d_{\text{tratado}} \rangle = 0.809 \text{ mm}$$

Verifica-se que do tecido natural para o tecido tratado há um aumento de espessura média de 0.297 mm devido ao tratamento com a Glicerina a 87%.

Mais uma vez se verifica a ocorrência de alterações na distribuição interna das fibras musculares. Comparando a fotografia do tecido tratado com a Glicerina a 87% representada na figura 40 com a fotografia do tecido natural representada na figura 7 b), podemos verificar que o tecido tratado apresenta uma distribuição de fibras mais concentrada em certas zonas do que em outras. O diâmetro médio das fibras também diminui com o tratamento aplicado com a Glicerina a 87%.

Relativamente ao número de fibras, verificamos neste caso a existência de apenas 11, o que indica que esta solução de Glicerina se introduziu fortemente para o espaço entre as fibras.

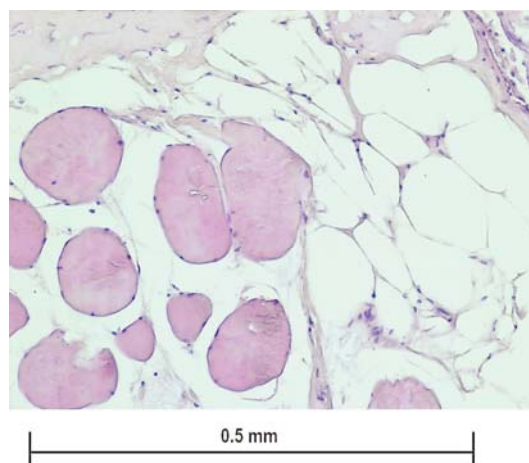


Figura 40: Fotografia do tecido tratado com Glicerina 87% com ampliação de 10x

Para caracterizarmos o efeito de transparência temporária criado pela Glicerina em solução de 87% reunimos toda a informação obtida neste estudo. Assim, verificamos um aumento na transmitância por adição do agente ao longo do tempo. Visto que a concentração deste agente é muito elevada, verificamos que em regime linear a tendência apresenta um maior crescimento do que no caso do agente apresentado anteriormente, tal como tinha acontecido do Etileno Glicol a 75% para o Etileno Glicol a 87%. Também devido a este aumento na concentração do último caso apresentado para o presente, verificamos uma maior diminuição de massa. O pH diminui menos devido ao valor mais elevado do pH da Glicerina a 87% em comparação com a solução de concentração 75%. O maior aumento de índice de refração relaciona-se com uma maior presença de agente neste caso relativamente ao caso da Glicerina a 75% e à consequente adaptação de índices de refração que ocorre de forma mais forte. A ocorrência de oscilações na transmitância nos instantes iniciais de tratamento verifica-se pelas razões já discutidas. O comportamento temporal da transmitância é em tudo semelhante ao verificado e já discutido para o Etileno Glicol na mesma concentração, embora apresente níveis ligeiramente superiores no presente caso. Ocorrem também um aumento na espessura média do tecido e uma redução do número de fibras por área da secção recta do tecido superiores ao que foi verificado para a Glicerina a 75%. Os diâmetros médios destas fibras são também reduzidos devido à pressão causada pelo agente já no espaço intersticial.

Se compararmos com o Etileno Glicol na mesma concentração, verificamos variações no mesmo sentido para todos os parâmetros. A massa diminui menos neste caso e o pH um pouco mais. A espessura média aumenta mais para esta solução, o que de alguma

forma compensa a menor redução de massa comparando com o Etileno Glicol na mesma concentração. Isto indica um efeito de transparência temporário de grandeza superior para a Glicerina a 87%. Desta forma, tal como verificado para o caso do Etileno Glicol, o aumento de concentração de 75% para 87% proporciona a criação de um efeito de transparência de maior magnitude. No entanto, comparando entre os dois tipos de agente, verificamos que os efeitos criados pelas soluções de Glicerina são superiores aos criados pelas soluções de Etileno Glicol, com a evolução de concentrações. Também no caso da Glicerina se verifica a dependência entre o efeito criado no tecido e a concentração do agente aplicado: Com o aumento da concentração do agente observamos efeitos de transparência temporária superiores assim como maiores variações nos parâmetros estudados.

#### **4.3 Estudo comparativo entre efeitos criados por diferentes agentes osmóticos**

Neste estudo vamos estudar os efeitos de transparência temporários que são criados nos tecidos por diferentes tipos de soluções osmóticas.

Iremos utilizar a Glicerina numa concentração a 50% em solução aquosa, a Glucose numa concentração a 40% em solução aquosa, o Etileno Glicol numa concentração a 99% em solução aquosa, o Propileno Glicol no seu estado puro e uma mistura contendo Etanol, Glicerina e Água destilada nas proporções de 1:1:2.

A metodologia para cada um destes casos é semelhante à que foi utilizada no estudo das diferentes concentrações de Glicerina e Etileno Glicol, embora no presente estudo se considerem para cada agente, os espectros medidos em 5 estudos experimentais independentes para cálculo de um efeito médio que será apresentado por agente. Também os restantes parâmetros, à excepção do índice de refração serão apresentados em valor médio dos 5 estudos realizados para os tecidos naturais e tecidos tratados. Lembramos que o índice de refração medido nos tecidos tratados não pode ocorrer em cada estudo experimental devido à localização do Refractómetro de Abbe que é distinta da localização da restante instrumentação experimental.

Inicialmente iremos caracterizar o tecido natural em termos de parâmetros médios relativamente aos 5 estudos experimentais realizados com os vários agentes considerados.

### 4.3.1 Caracterização do tecido natural médio

Em todos os estudos experimentais realizados com os diversos agentes, consideramos um tecido que não foi submetido a tratamento osmótico para obtermos uma referência natural. Tais tecidos foram avaliados em termos de massa, pH, espessura média e distribuição de fibras no seu interior. Dado que para estes tecidos, a massa e o pH não variam, vamos nesta secção apenas caracterizar o tecido médio em termos histológicos e de espessura natural média. Deixamos as variações de massa e pH para cada estudo em particular. Na figura seguinte encontram-se apresentadas duas fotografias em corte histológico de tecidos naturais provenientes dos grupos O e H (ver tabela 6) de um estudo particular:

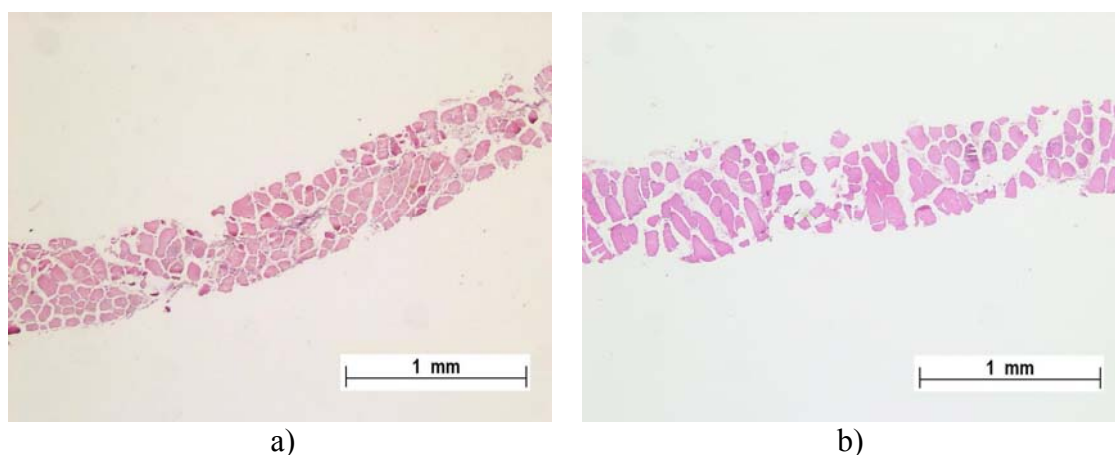


Figura 41: Fotografias do tecido natural com ampliação de 2x: a) do grupo O e b) do grupo H

Pela figura anterior, e considerando todas as fotografias recolhidas dos tecidos naturais provenientes dos diversos estudos experimentais vamos calcular as espessuras médias para os tecidos naturais dos grupos O e H:

Tabela 36: Espessura média dos tecidos naturais inseridos nos grupos O e H

Espessuras médias	
Grupo O	Grupo H
0.615	0.551

Em termos de distribuição das fibras musculares no interior dos tecidos e da sua dimensão média iremos efectuar uma avaliação estatística para os diversos estudos. Tal avaliação será quantitativa em termos da densidade de fibras por fotografia e perceptiva em termos do diâmetro médio devido à ocorrência natural de fibras com diversos diâmetros e também de fibras cortadas em secções não perfeitamente ortogonais ao seu comprimento. Desta forma representamos aqui duas fotografias típicas de estudos realizados para o tecido natural dos grupos O e H:

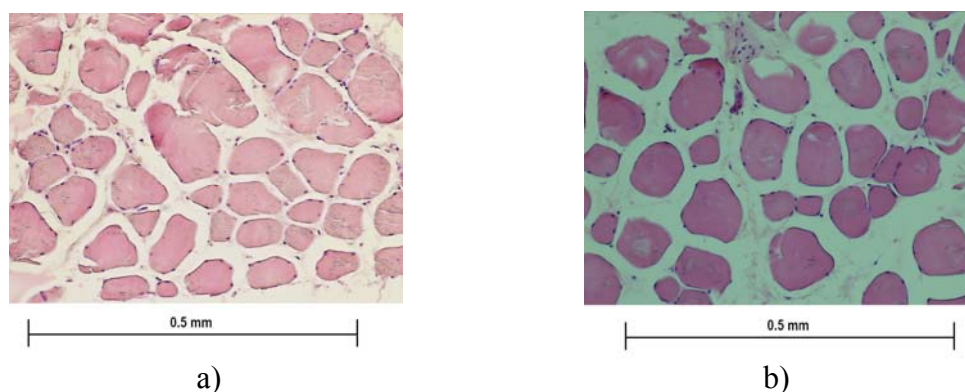


Figura 42: Fotografias do tecido natural com ampliação de 10x: a) do grupo O e b) do grupo H

Para os tecidos utilizados nos 5 estudos experimentais, calculamos para cada um dos 2 grupos o número médio de fibras por área das fotografias tiradas com a mesma ampliação. Esses valores médios encontram-se apresentados na tabela 37:

Tabela 37: Numero médio de fibras musculares por área de fotografia em cada grupo

Número médio de Fibras	
Grupo O	Grupo H
<43>	<43>

Passamos agora a estudar cada um dos agentes para identificar as variações ocorridas em relação à situação natural dos tecidos.

#### 4.3.2 Glicerina 50%

A Glicerina numa concentração de 50% apresenta os valores de pH e índice de refração apresentados na tabela 24 acima. Embora já tenhamos estudado a Glicerina nesta concentração, vamos aqui considerar este agente para posterior comparação com os restantes em termos dos efeitos criados.

Os parâmetros médios (média dos 5 estudos) calculados dos valores medidos nos tecidos antes do tratamento com esta solução foram calculados e estão representados na tabela seguinte:

Tabela 38: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Glicerina 50%

Parâmetros iniciais do tecido		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.15 g	6.30 a <23.88°C>	1.3980

Os tecidos foram submetidos ao estudo óptico, começando por medir-se a sua transmitância natural e depois em intervalos de tempo que variam ao longo do estudo de acordo com o que foi descrito na metodologia.

Para este caso, apresentamos uma evolução típica do espectro de transmitância durante o período de imersão do tecido para verificarmos como se comporta a transmitância espectral sob a acção do agente em função do tempo.

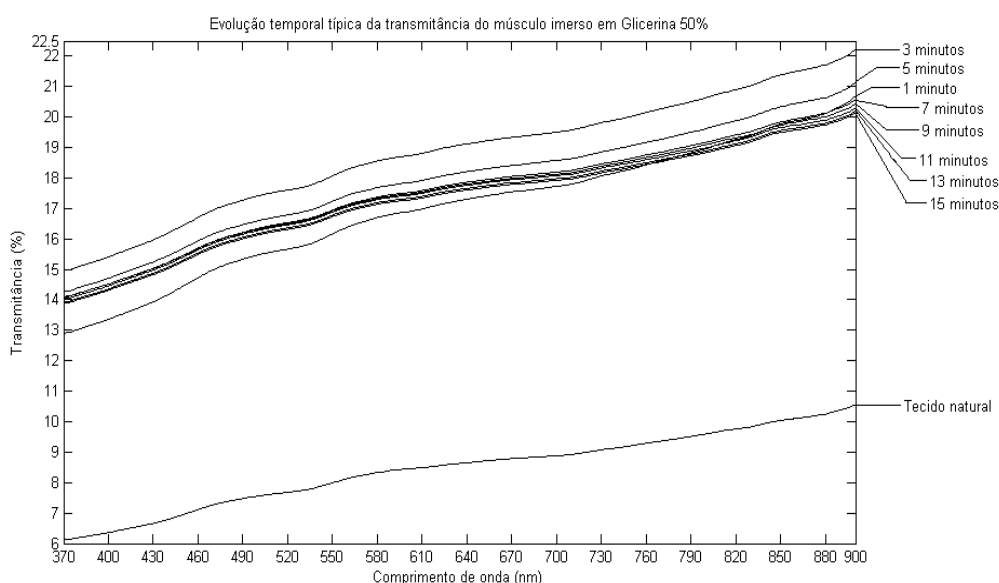


Figura 43: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso em Glicerina 50%

Os espectros representados na figura anterior correspondem a um dos estudos realizados. Para este mesmo estudo experimental escolhemos novamente os comprimentos de onda adoptados nos estudos anteriores, para representarmos a evolução da transmitância típica para alguns comprimentos de onda específicos e uniformemente distribuídos na banda de aquisição do espectrofotómetro:

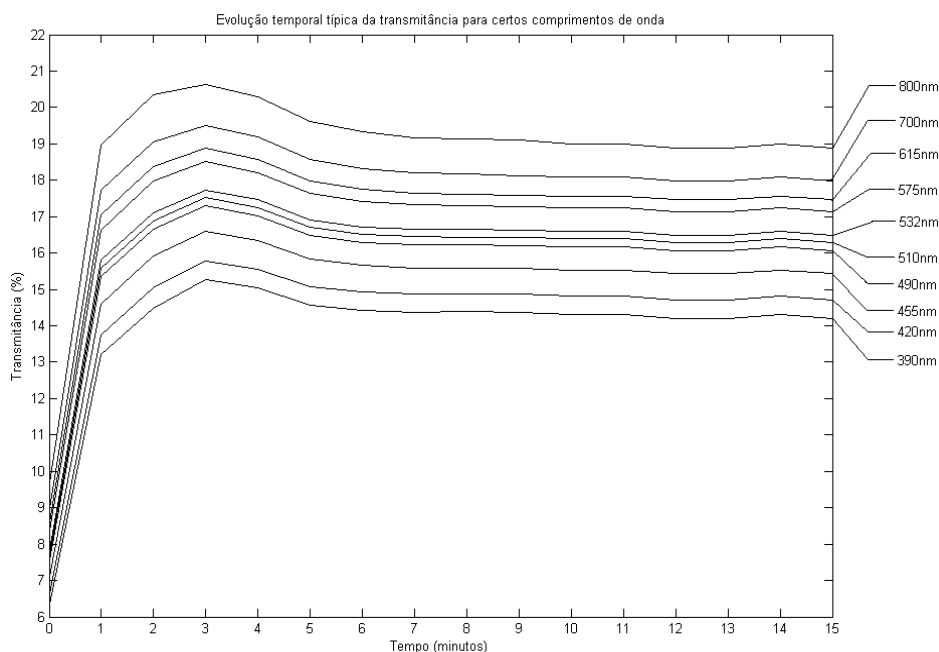


Figura 44: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50%

Para os 2 primeiros minutos de tratamento osmótico, representamos uma evolução típica, para demonstrar a existência das oscilações iniciais da transmitância para todos os comprimentos de onda considerados:

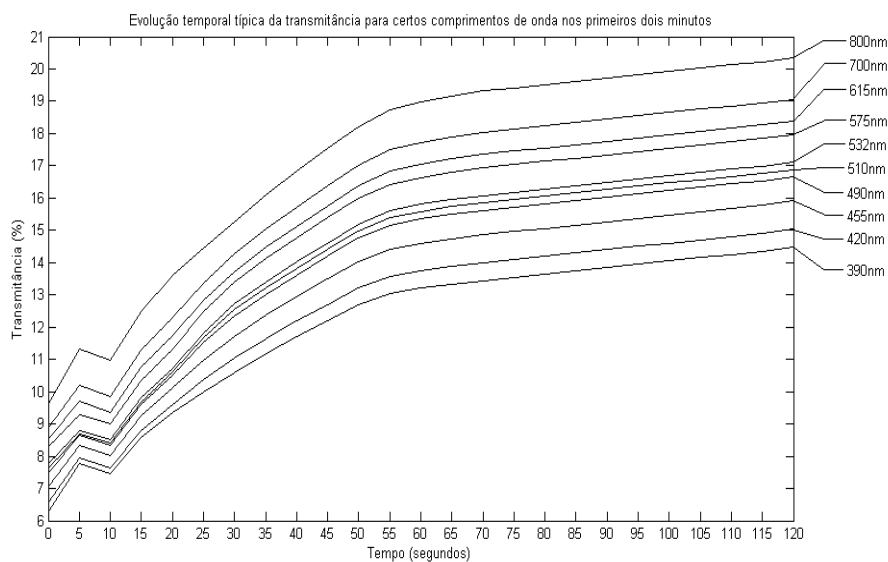


Figura 45: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glicerina 50% nos primeiros 2 minutos de tratamento

Com os espectros medidos em todos os 5 estudos calculamos a evolução média da transmitância para os comprimentos de onda considerados para efectuarmos as



representações seguintes. Para este tipo de cálculo, é necessário em cada estudo normalizar os espectros relativamente à transmitância natural para podermos ter uma mesma referência entre os vários estudos para o cálculo das médias espectrais. Este procedimento é necessário uma vez que nos diversos estudos, os tecidos naturais apresentam transmitâncias ligeiramente diferentes. Devido a este procedimento, as curvas representadas nas duas figuras seguintes apresentam uma concordância a 100% na origem do tempo, começando a divergir a partir daí em maior ou menor proporção.

Na figura 46, apresentamos a evolução temporal média que a transmitância apresenta para os diferentes comprimentos de onda considerados durante o tempo de tratamento com a Glicerina a 50%. Este gráfico apresenta um rápido crescimento no primeiro minuto e posteriormente uma inversão suave dessa tendência crescente até ao terceiro minuto onde a transmitância começa a diminuir um pouco antes de entrar no regime de saturação. Este regime é ligeiramente decrescente, conforme podemos verificar.

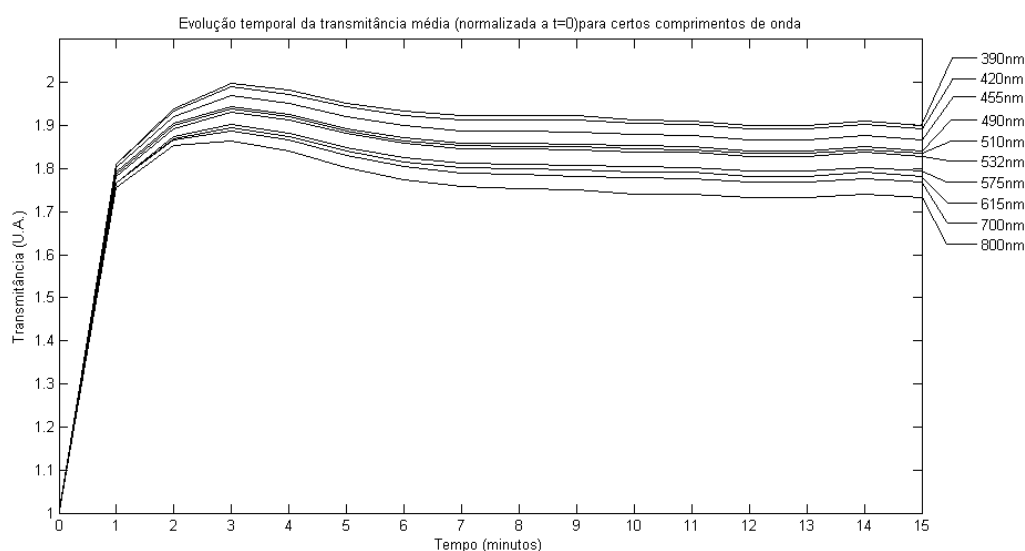


Figura 46: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glicerina 50%

Por termos calculado a transmitância média em cada instante normalizada à transmitância natural dos tecidos, representamos na figura anterior a transmitância média em unidades arbitrárias (U. A.). Na figura 47, verificamos que devido à existência de oscilações iniciais em cada estudo, também a variação média da transmitância apresenta essas oscilações.

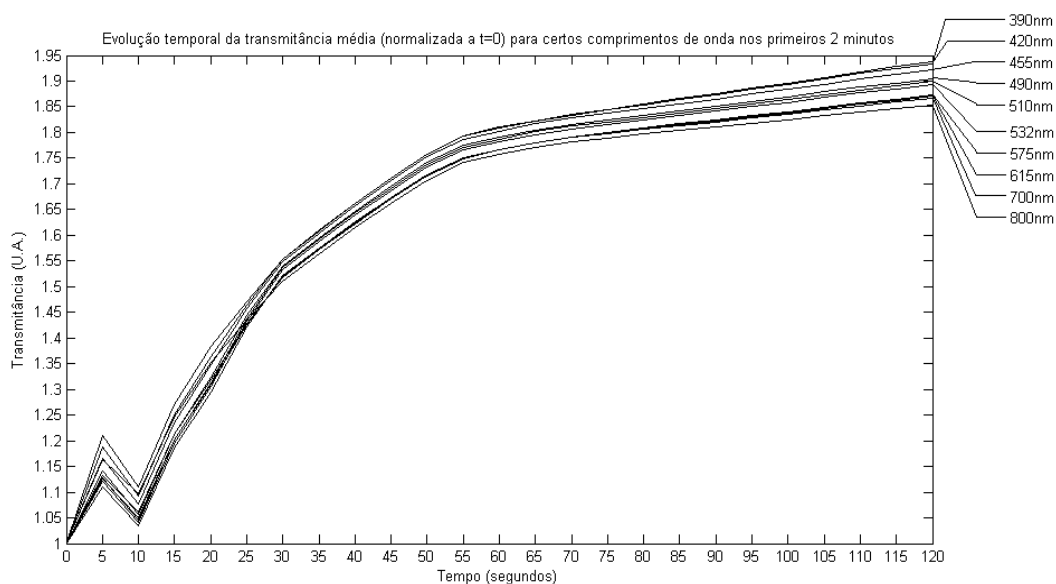


Figura 47: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glicerina 50% nos primeiros 2 minutos de tratamento

Verificamos que as oscilações iniciais estão presentes nas curvas médias representadas na figura 47. A sua explicação é a mesma que demos no caso do Etileno Glicol a 50%, visto apresentarem a mesma forma gráfica. Para as duas representações anteriores, determinamos para cada instante de tempo o desvio padrão normalizado em relação à média calculada para podermos calcular a dispersão experimental. Desta forma podemos representar as curvas temporais que nos indicam uma medida de dispersão entre os diversos estudos realizados em relação à média calculada ao longo do tempo.

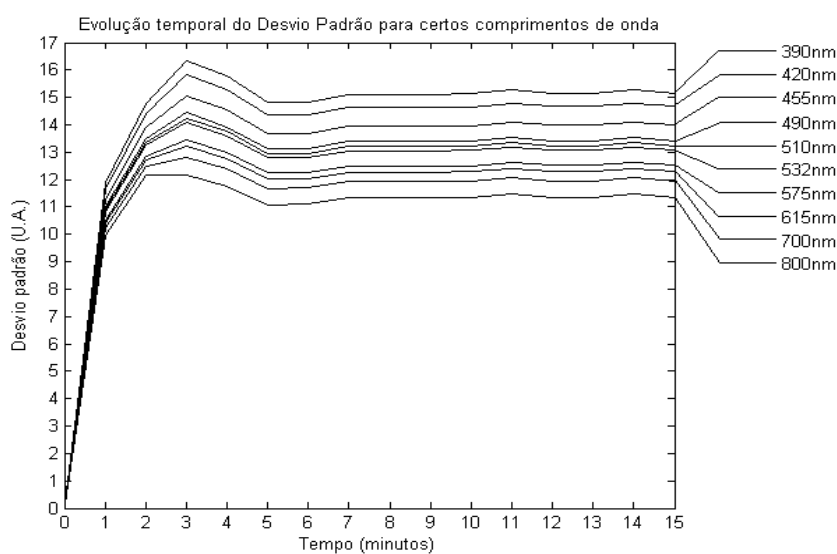


Figura 48: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Glicerina 50%

O desvio padrão representado na figura anterior e também em todos os gráficos de desvio padrão que iremos apresentar adiante representam o desvio padrão real calculado dividido pela média em cada instante de tempo. Adoptamos este tipo de representação para detectar eventuais mudanças de tendência localizadas que possam ocorrer na evolução média da transmitância e que seriam imperceptíveis adoptando representações do desvio padrão real. Desta forma se pretendermos determinar em algum instante de tempo o real desvio padrão, devemos multiplicar os valores verificados para esse instante nos gráficos de desvio padrão e de evolução média da transmitância correspondente.

Considerando este tipo de representação e para o valor máximo no gráfico anterior (verificado para  $t=3$  minutos), podemos determinar o real valor de desvio padrão nesse instante de tratamento. Para  $t=3$  minutos, o valor do gráfico anterior vale  $\sim 16$ , no gráfico correspondente da evolução média da transmitância (figura 46) vale  $\sim 2$ . Assim, obtemos 32% de desvio experimental relativamente à transmitância média calculada nesse instante de tratamento. Trata-se de um valor elevado.

No caso da evolução da transmitância para os primeiros 2 minutos de tratamento (figura 47), verificamos que as curvas iniciam a sua evolução temporal muito aproximadas devido à normalização dos espectros relativamente à transmitância natural em cada estudo individual. Esta aproximação entre as curvas vai diminuindo ao longo do tempo devido ao aumento de diferenças experimentais ocorridas entre os vários estudos realizados. Para o caso de maior desvio representado na figura 47, podemos calcular um desvio padrão real de 29.25% para a curva do comprimento de onda de 390 nm, se multiplicarmos os valores observados a  $t=120$  segundos e para o comprimento de onda considerado nas figuras 47 e 49. Mais uma vez o valor do desvio padrão é elevado.

Verificamos a ocorrência de diferenças significativas relativamente à média calculada para os estudos experimentais realizados. Estas diferenças estão certamente relacionadas com a variação de algum factor experimental entre os 5 estudos experimentais realizados com a Glicerina 50%. Tal variação ocorreu de forma imperceptível.

A evolução temporal do desvio padrão para os primeiros 2 minutos de tratamento osmótico encontra-se representada na figura seguinte:

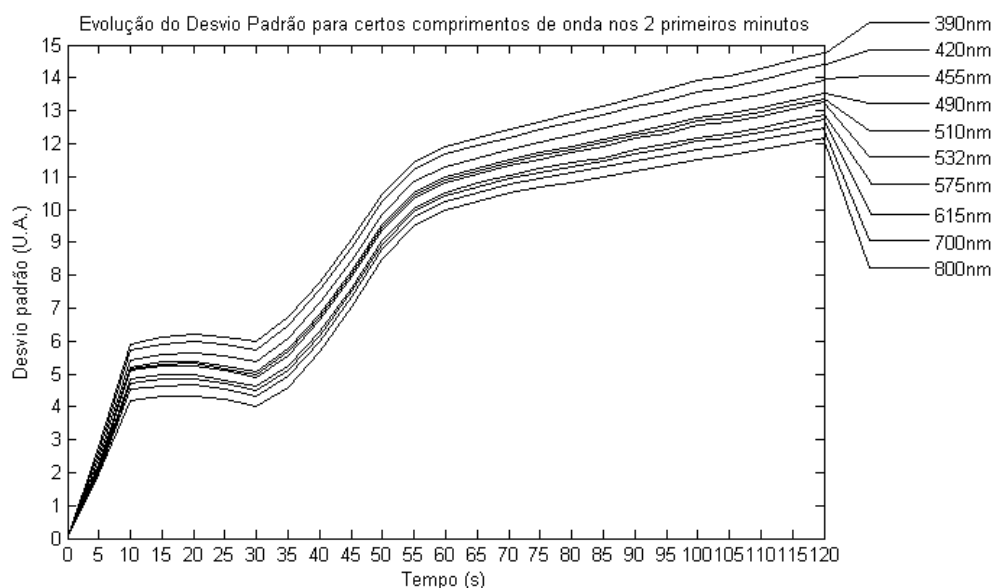


Figura 49: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Glicerina 50%

Finalmente, considerando os espectros médios calculados para cada instante de tempo normalizados à transmitância natural dos tecidos, podemos representar a sua evolução temporal nos primeiros dois minutos para verificarmos a ocorrência bem evidenciada de bandas de absorção nos instantes de 5, 10, 15, 20 e 25 segundos de tratamento com a Glicerina 50%:

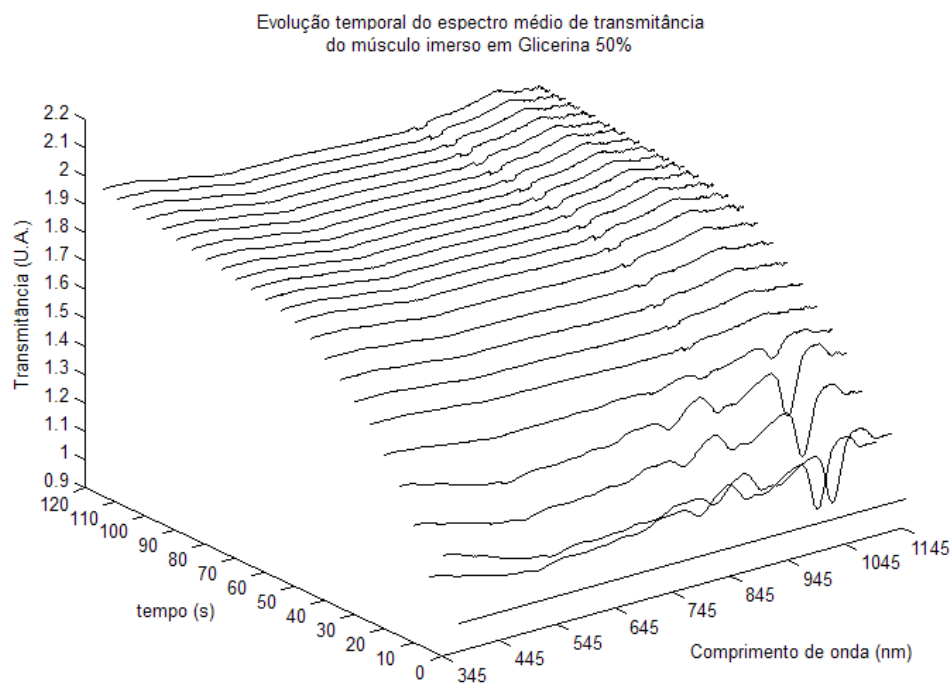


Figura 50: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Glicerina 50% médio nos primeiros 2 minutos

Note-se na figura anterior, que por normalização espectral em relação ao espectro de transmitância natural para cada instante, e também pelo cálculo da média dos 5 estudos, podemos observar com maior clareza as bandas de absorção. Estas assinaturas espectrais ficam mais evidenciadas depois de retirada a forma espectral característica da transmissão do tecido.

Após serem estudados os efeitos de transparência ópticos nos diversos estudos realizados com a Glicerina a 50%, foram medidos os parâmetros finais dos vários tecidos. Na tabela seguinte encontram-se os valores médios desses parâmetros.

Tabela 39: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Glicerina 50%

<b>Parâmetros finais do tecido médio</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.11 g	6.02 a <24.16°C>	1.4030

Comparando os valores representados nas tabelas 38 e 39, verificamos que a massa sofreu uma diminuição de 0.04 gramas, o pH diminuiu de 0.28 (desprezando a pequena diferença de temperaturas) e o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4030. A perda de massa deve-se à perda de água que o tecido sofreu, assim como a diminuição do pH, visto que o pH da água é próximo de 7 à temperatura ambiente. O aumento do índice de refração do tecido é causado pela adaptação de índices que ocorre por difusão do agente para o espaço inter-fibras do tecido.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, da Glicerina a 50% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada equação 16, resultando o valor de 0.63. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o tecido deve conter ainda alguma percentagem de água no seu interior.

Vamos agora estudar as variações de espessura do tecido, da disposição das fibras e da sua dimensão média devido ao tratamento aplicado. Iremos considerar as variações médias relativamente aos 5 estudos, embora apresentemos aqui fotografias de um estudo em particular. Iremos também comparar os efeitos histológicos entre os tecidos dos grupos O e H (ver tabela 6) para detectar eventuais efeitos criados pela radiação óptica que atravessou os tecidos do grupo O.

Apresentamos de seguida as fotografias tiradas de um tecido tratado com Glicerina 50%. Este tecido e os dos restantes estudos experimentais realizados com a Glicerina a 50% foram analisados para calcular a espessura média e do número médio de fibras após tratamento com a Glicerina a 50%. Tais valores encontram-se na tabela 40.

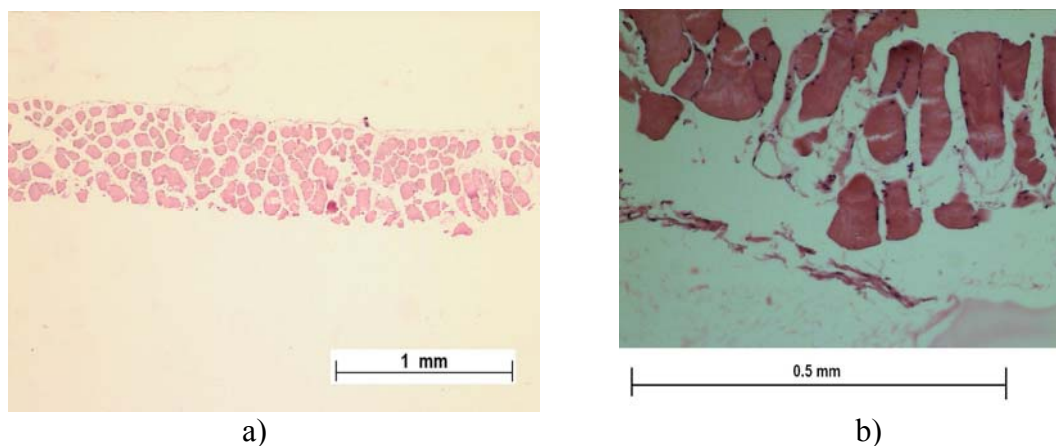


Figura 51: Fotografias de um tecido tratado com Glicerina 50%: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x

Tabela 40: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Glicerina a 50%

Tratamento com Glicerina a 50%			
Espessura média		Número médio de fibras musculares	
Grupo O	Grupo H	Grupo O	Grupo H
0.694	0.619	20	28

Comparando as espessuras médias dos tecidos naturais (tabela 36) com as dos tecidos tratados com Glicerina a 50%, verificamos um aumento pouco significativo para os tecidos do tipo H. Por outro lado, os tecidos do tipo O apresentam um aumento maior. Relativamente ao número de fibras médio para cada situação, verificamos uma diminuição para os tecidos dos dois grupos, embora a que se verifica para os tecidos do tipo O seja maior. Esta variação distinta para os dois grupos de tecidos, relativamente à espessura média e ao número médio de fibras por secção do tecido sugere a existência de um fenómeno paralelo à criação do efeito de transparência para os tecidos do grupo O. Para além da imersão em agente osmótico, os tecidos do tipo O foram sujeitos a um aumento de temperatura mais localizado na zona central dos tecidos. Este aumento de temperatura é causado pela radiação da fonte na zona de medição. Como já discutimos

no estado da arte e como é explicado na literatura <sup>(1, p:205-211)</sup>, as variações de temperatura assumem um papel importante na criação de efeitos de transparência nos tecidos biológicos, verificando-se variações de espessura na amostra e também alteração na estrutura interna dos constituintes tecidulares.

Neste caso estudado com a solução de Glicerina a 50%, verificamos a criação do efeito de transparência temporário acompanhada de uma diminuição de massa e de pH que tem a ver com a desidratação do tecido e difusão do agente para o seu interior. O aumento de índice de refração global do tecido durante o tratamento é causado pela inserção do agente, que origina a adaptação de índices de refração no interior do tecido. A forma mais dispersa das fibras por área da secção recta do tecido tratado assim como a diminuição dos seus diâmetros revela a inserção do agente para o espaço inter-fibras e a pressão osmótica que cria sobre os constituintes sólidos do tecido.

#### 4.3.3 Glucose 40%

Para o caso da glucose, utilizamos uma solução aquosa com concentração de 40%. Esta solução apresentava os seguintes parâmetros na altura de realização dos estudos experimentais:

Tabela 41: Parâmetros medidos na solução de Glucose 40%

Parâmetros medidos no agente	
pH	Índice de Refracção
4.42 a 24.9°C	1.3850

Considerando os tecidos estudados com esta solução, calculamos a média dos seus parâmetros iniciais. Estes valores encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 42: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Glucose 40%

Parâmetros iniciais do tecido		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.13 g	6.34 a <23.98°C>	1.3980

Cada tecido foi submetido ao estudo óptico, medindo-se inicialmente a sua transmitância natural de depois em intervalos de tempo que variam no tempo de acordo

com o que foi descrito na metodologia. Na figura seguinte encontra-se representada uma variação típica da transmitância de um tecido imerso em Glucose a 40%:

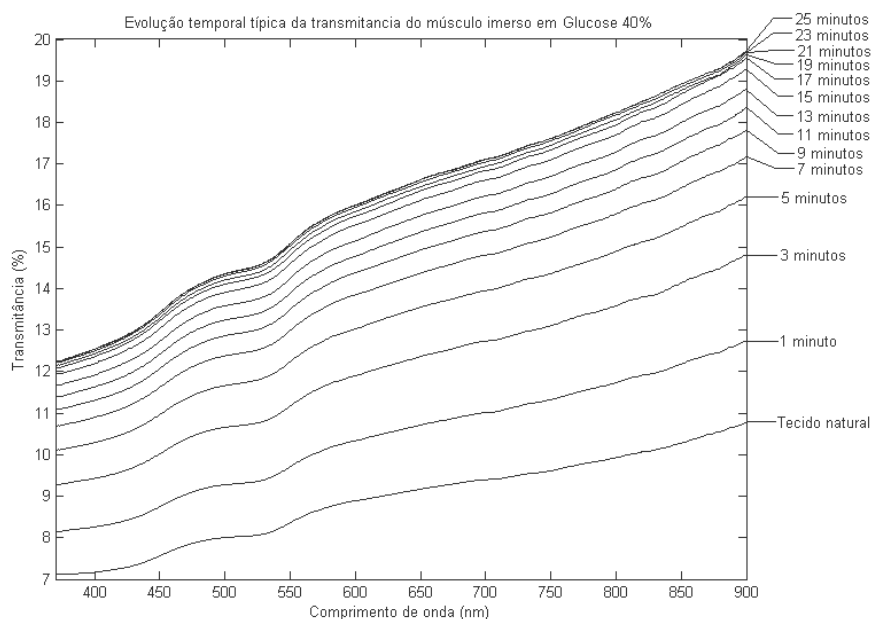


Figura 52: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso em Glucose 40%

Para o mesmo estudo experimental de onde se retirou esta representação, escolhemos os comprimentos de onda que temos utilizado para representar a evolução da transmitância típica ao longo do tempo. Vejamos a representação minuto a minuto durante o período de imersão:

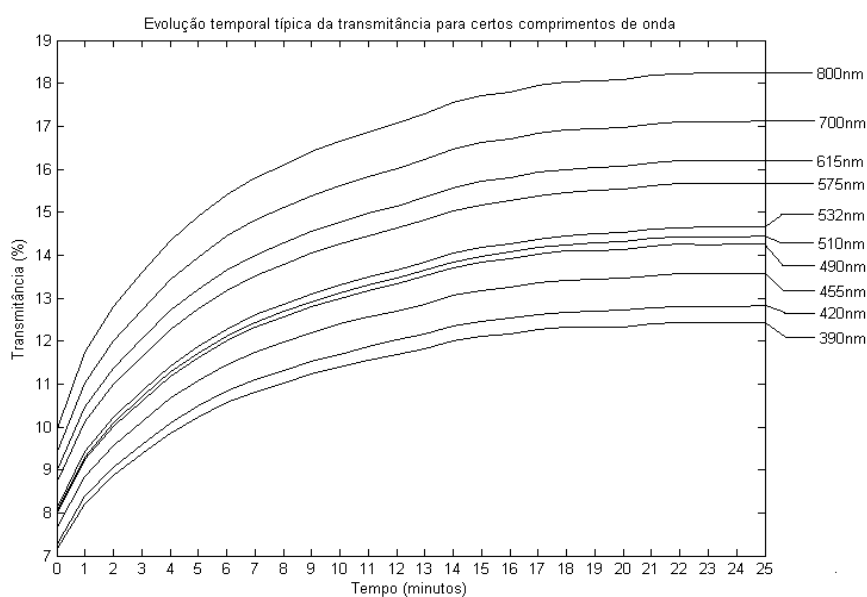


Figura 53: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glucose 40%



Para o período inicial onde ocorrem as oscilações, verificamos a seguinte evolução temporal típica da transmitância:

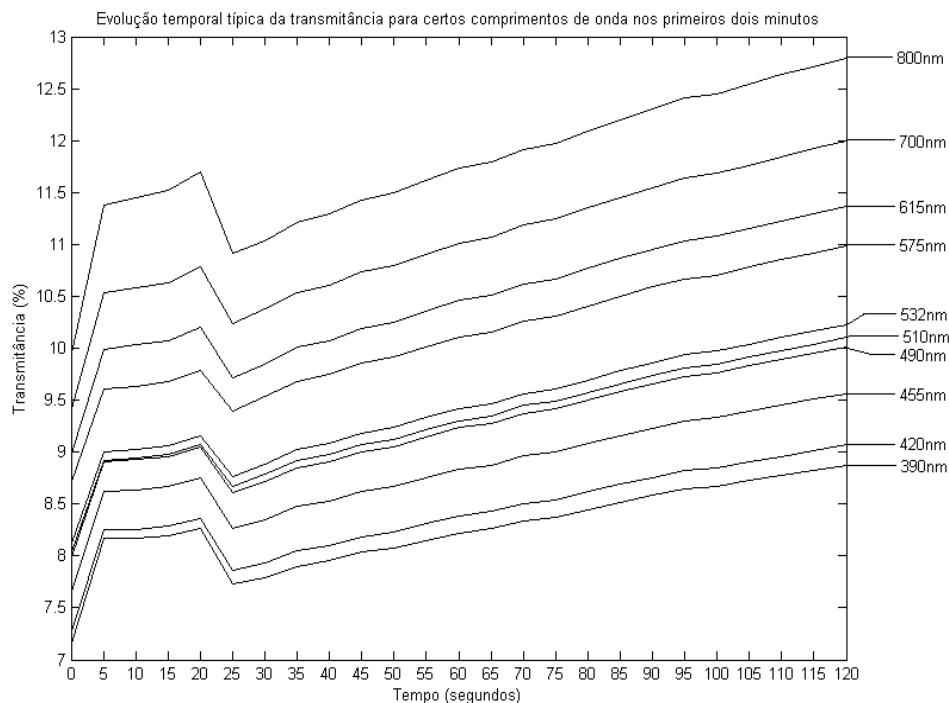


Figura 54: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Glucose 40% nos primeiros 2 minutos de tratamento

Verificamos que as oscilações produzidas pela Glucose a 40% são distintas das que até aqui temos observado. Como esta forma de oscilações ocorreu em todos os casos estudados com a Glucose, iremos representar as evoluções médias e posteriormente dar uma explicação.

Começamos por calcular os espectros médios dos 5 estudos realizados com este agente para cada medição temporal efectuada. Mais uma vez, como os diferentes tecidos utilizados apresentavam transmitâncias naturais ligeiramente diferentes, para o cálculo dos espectros médios, normalizamos cada espectro relativamente ao espectro de transmitância natural do mesmo estudo. Posteriormente seleccionamos os comprimentos de onda habituais para fazermos a representação da evolução temporal da transmitância durante o período de tratamento por imersão.

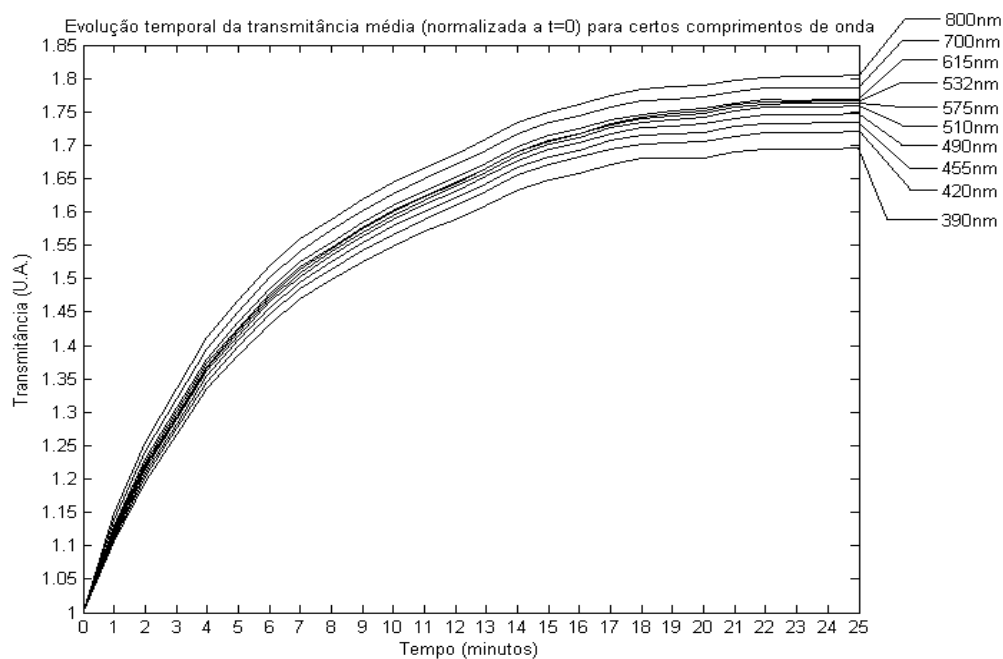


Figura 55: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glucose 40%

O mesmo foi feito para os primeiros 2 minutos de tratamento, de forma a identificarmos as oscilações médias causadas por este tipo de tratamento osmótico.

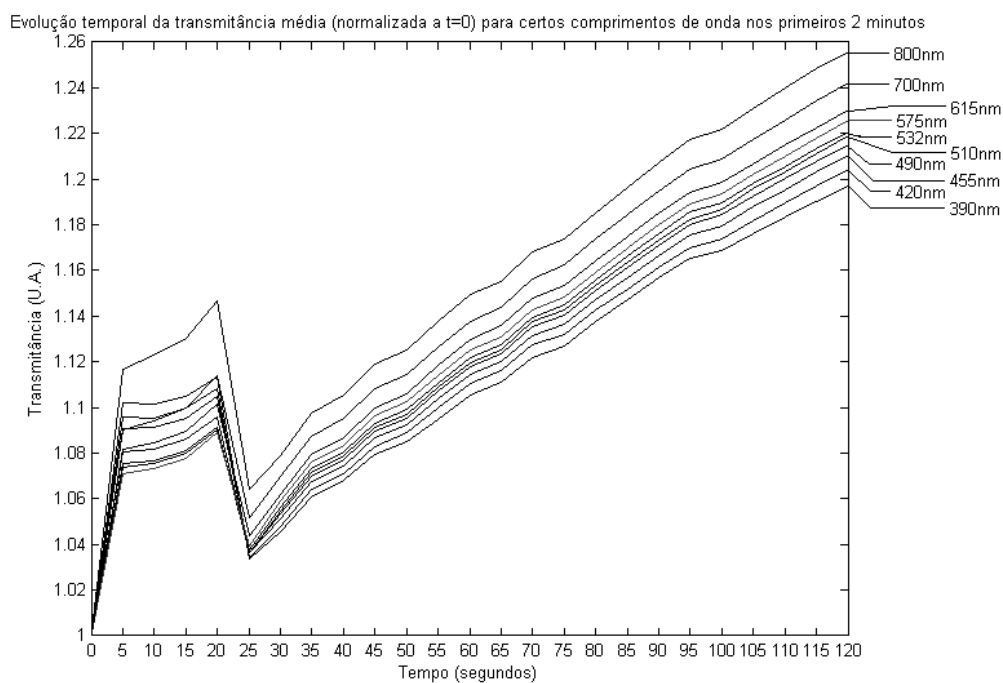


Figura 56: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Glucose 40% nos primeiros 2 minutos de tratamento

Verificamos mais uma vez, a ocorrência das oscilações iniciais com forma diferentes das apresentadas para os outros agentes já estudados.

Na figura 56 observamos uma subida inicial da transmitância entre  $t=0$  e  $t=5$  segundos, que demonstra uma pequena difusão inicial de agente para o interior do tecido. Para o caso do músculo, a Glucose a 40% pode apresentar um coeficiente de difusão pequeno quando comparado com a Glicerina e o Etileno Glicol nas diferentes concentrações já estudadas. Se assim é, a pequena quantidade de Glucose que se difundiu para o interior do tecido não é suficiente para criar a pressão osmótica necessária para o início da desidratação. O comportamento verificado entre  $t=5$  e  $t=20$  segundos demonstra uma difusão adicional do agente menos intensa para o interior do tecido até que seja atingida a concentração necessária para a criação de uma pressão osmótica de grandeza suficiente para forçar a saída de água. Neste instante ( $t=20$  segundos), a água a rápida saída dos espaços intersticiais do tecido, o que origina uma aproximação dos constituintes sólidos do tecido que se organizam agora num volume menor. Este arranjo da parte sólida do tecido em menor volume diminui a transmissão da radiação óptica devido ao aumento momentâneo do espalhamento que tem origem numa grande distribuição volumétrica de diferenças pontuais de índice de refração. Esta diminuição na transmissão é observada entre  $t=20$  e  $t=25$  segundos na figura anterior. O agente osmótico passa a difundir-se gradualmente para o interior do tecido para se localizar no espaço entre os constituintes sólidos. Difunde-se para o interior do volume de sólido que anteriormente diminuía a transmissão da radiação óptica devido a um elevado número de diferenças pontuais de índice de refração e consequentemente aumentava o espalhamento. Este processo é rápido inicialmente, entre  $t=25$  segundos e  $t=8$  minutos (conforme podemos confirmar pelas duas figuras anteriores), mas tende a diminuir quando os espaços intersticiais se encontram quase saturados de agente, entre  $t=8$  e  $t=25$  minutos (conforme podemos verificar pela figura 55). A inserção do agente nos espaços intersticiais causa uma maior adaptação de índices de refração entre os constituintes sólidos do tecido (causadores do espalhamento) e os fluidos intersticiais para onde o agente migrou.

Tal como no caso da Glicerina 50% anteriormente apresentado, representamos aqui a evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à evolução temporal média da transmitância.

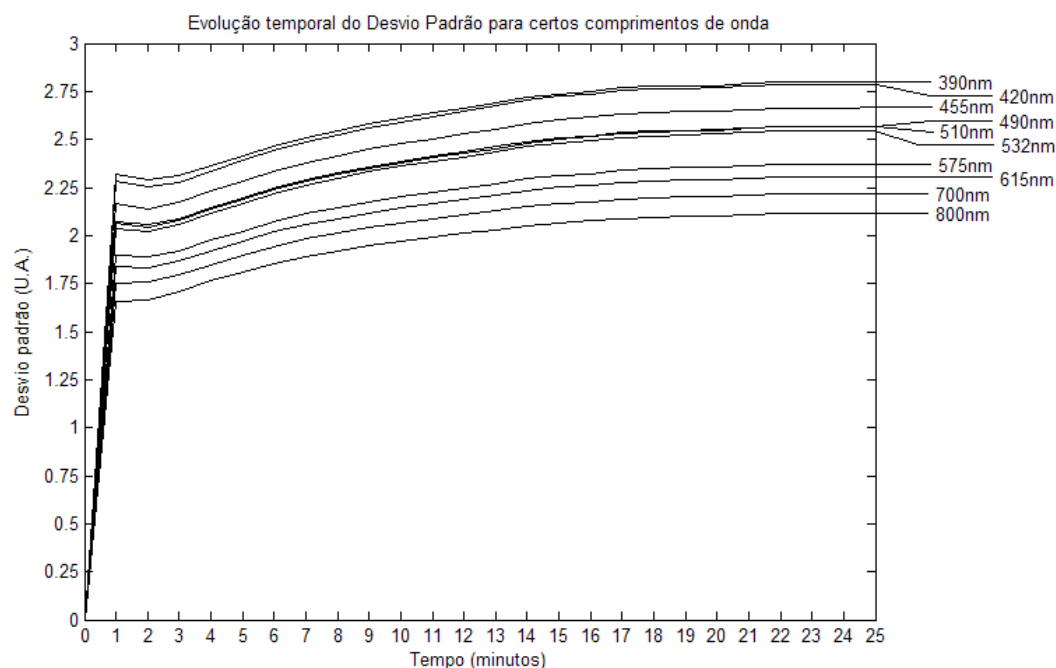


Figura 57: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Glucose 40%

Nesta representação global da evolução do desvio padrão calculado para os estudos realizados com Glucose 40%, verificamos uma elevada concordância inicial para os vários comprimentos de onda. Esta concordância inicial é imposta pela normalização de todos os espectros relativamente à transmitância natural de cada tecido estudado experimentalmente. Esta normalização prende-se com a necessidade de uma mesma referência para todos os 5 estudos no instante inicial de representação da evolução da transmitância do tecido, para permitir o cálculo das médias e do desvio padrão.

Após o 1º minuto, observamos um comportamento idêntico entre os diferentes comprimentos de onda, embora com diferentes níveis de grandeza. Para a situação de maior desvio padrão neste gráfico, que corresponde à curva do comprimento de onda de 390 nm, e para o instante de tempo de 25 minutos, temos um desvio máximo absoluto de 5.1% relativamente à média calculada. Isto demonstra uma grande concordância entre os espectros obtidos nos diferentes estudos.

Da mesma forma, para os 2 minutos iniciais de tratamento dos tecidos, temos a seguinte variação temporal do desvio padrão normalizado:

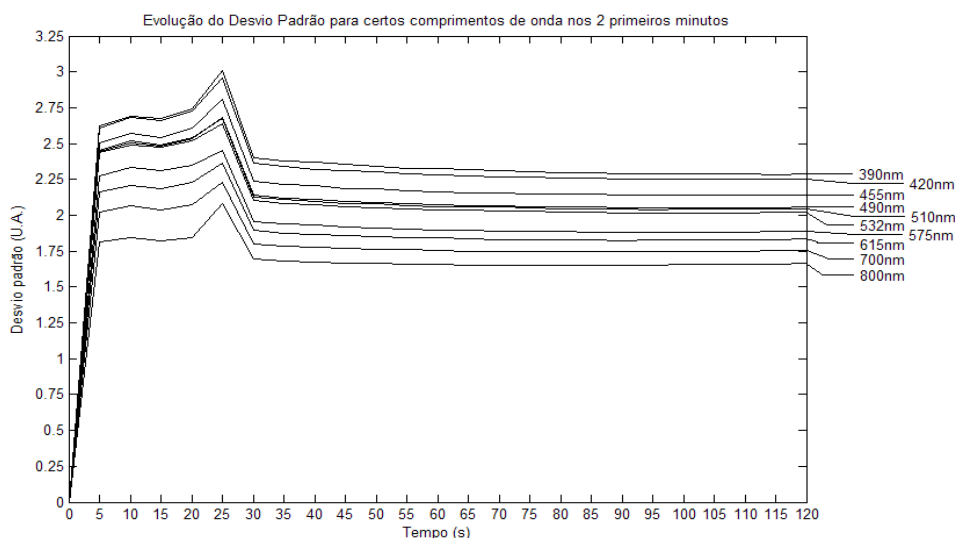


Figura 58: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Glucose 40%

Também nesta representação ocorrem oscilações iniciais. A 25 segundos verificamos um máximo no gráfico anterior, também para a curva dos 390 nm. Nesse instante de tempo, verificamos um desvio máximo de 3.42% relativamente à média calculada.

Apresentamos na figura seguinte a evolução temporal do espectro médio de transmitância nos primeiros 2 minutos de tratamento com Glucose 40%. Lembramos que os espectros representados na figura seguinte se encontram normalizados relativamente ao espectro natural do tecido, para que a eliminação da forma espectral do tecido natural, permita detectar de forma mais evidente eventuais alterações espectrais.

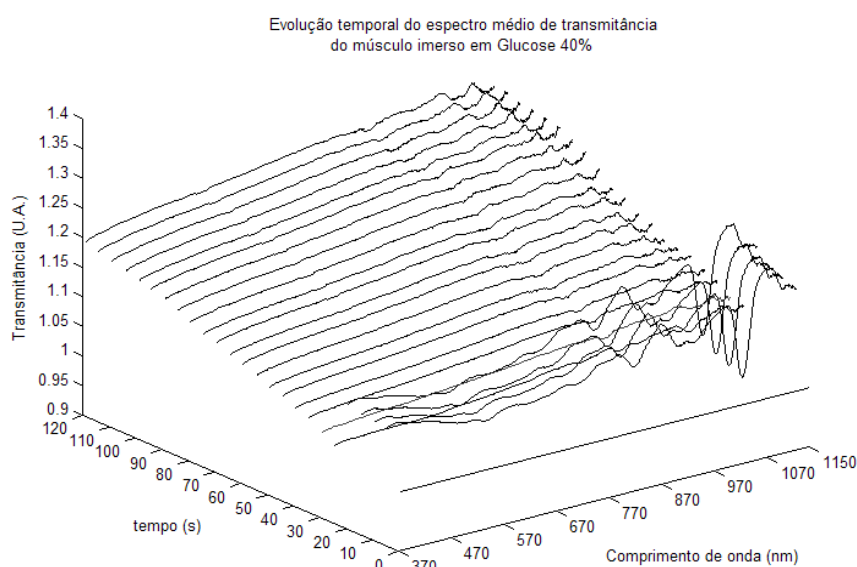


Figura 59: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Glucose 40% médio nos primeiros 2 minutos

Podemos observar que para os espectros medidos nos instantes de 5, 10, 15, 20 e 25 segundos ocorrem bandas de absorção dispersas pela zona do visível e também do infravermelho. Devemos ter em atenção que tais bandas apenas ocorrem para os cinco espectros medidos nos instantes de tempo referidos, desaparecendo posteriormente. Desta forma, estas bandas estão certamente relacionadas com elevados fluxos de líquido dentro do tecido. À semelhança dos estudos anteriores, estas bandas devem estar relacionadas com o fluxo de água para o exterior dos tecidos. As bandas no infravermelho são bem evidentes devido à normalização espectral, enquanto que as que ocorrem na zona do visível são menos pronunciadas.

No final do estudo óptico, foram medidos em cada estudo experimental, os parâmetros finais dos tecidos para determinar as variações ocorridas devido ao tratamento aplicado. Os valores médios calculados para os 5 estudos experimentais relacionados encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 43: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Glucose 40%

<b>Parâmetros médios finais dos tecidos</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.11 g	5.98 a <24.54°C>	1.3900

Comparando os parâmetros finais com os iniciais, representados nas tabelas 42 e 43, verificamos que a massa sofreu, em média uma diminuição de 0.02 gramas, o pH diminuiu em média 0.36 (desprezando a pequena diferença de temperaturas médias consideradas) e o índice de refração diminuiu de 1.3980 para 1.3900. A perda de massa deve-se à perda de água que o tecido sofreu, assim como a diminuição do pH, visto que o pH da água é próximo de 7 à temperatura ambiente. A diminuição verificada para o índice de refração do tecido é causada pela adaptação de índices que ocorre por difusão do agente para o espaço inter-fibras do tecido.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, da Glucose a 40% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.62. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o tecido deve conter ainda uma percentagem de água considerável no seu interior.

À semelhança do que fizemos no caso da Glicerina 50%, vamos agora estudar as variações de espessura dos tecidos, da disposição das fibras e da sua dimensão média devido ao tratamento aplicado. Iremos considerar as variações médias relativamente aos 5 estudos, embora apresentemos aqui fotografias de um estudo em particular. Iremos também comparar os efeitos histológicos entre os tecidos dos grupos O e H (ver tabela 6) para detectar eventuais efeitos criados pela radiação óptica que atravessou os tecidos do grupo O.

As fotografias apresentadas na figura seguinte correspondem a um tecido tratado com Glucose 40%. Os diversos tecidos utilizados nos 5 estudos experimentais com a Glucose a 40% foram analisados para calcular a espessura média e do número médio de fibras após tratamento osmótico. Tais valores encontram-se na tabela 44.

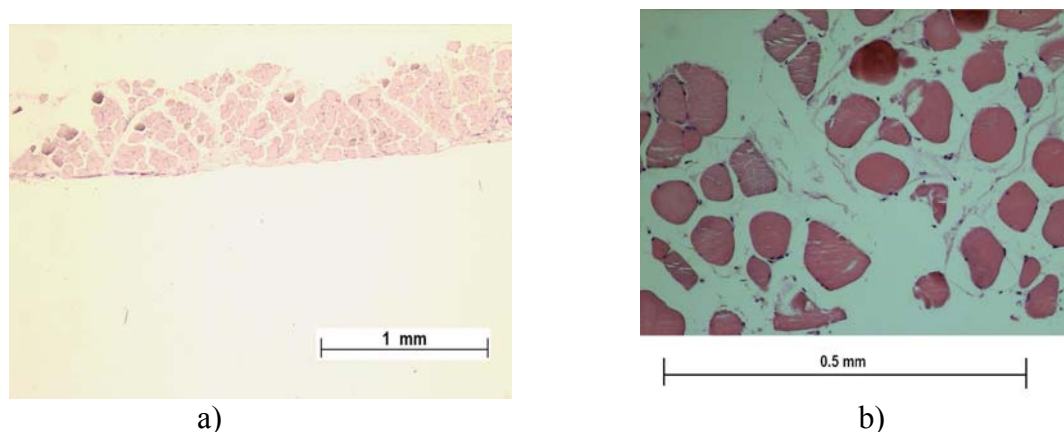


Figura 60: Fotografias de um tecido tratado com Glucose 40%: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x

Tabela 44: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Glucose a 40%

Tratamento com Glucose a 40%			
Espessura média		Número médio de fibras musculares	
Grupo O	Grupo H	Grupo O	Grupo H
0.705	0.632	31	31

Comparando as espessuras médias dos tecidos naturais (tabela 36) com os tecidos tratados com a Glucose a 40%, verificamos um aumento maior para os tecidos do grupo O. Os tecidos do grupo H sofrem um aumento da espessura média de 0.081, enquanto que os do grupo O aumentam de 0.09. Relativamente ao número médio de fibras por

área da secção recta dos tecidos verificamos uma diminuição igual para os tecidos dos dois grupos. Dado que o agente aplicado é o mesmo nos tecidos dos dois grupos considerados e o tempo de imersão é o mesmo, podemos atribuir a diferença verificada na variação de espessuras médias ao aumento de temperatura que os tecidos do grupo O sofreram com a radiação luminosa.

Para caracterizarmos o efeito de transparência criado pela Glucose a 40% podemos considerar que o efeito de transparência criado e observado opticamente é acompanhado de uma diminuição de massa e de pH. Estas variações indicam os processos de desidratação e de difusão do agente para o interior dos tecidos. Por outro lado, o aumento no índice de refração global do tecido médio com o tratamento explica o fenómeno de adaptação de índices de refração que ocorre no espaço inter-fibras. A diminuição do número de fibras por área de secção recta do tecido, assim como a diminuição visualizada dos seus diâmetros demonstram a inserção do agente para o interior do tecido e a pressão osmótica criada sobre as fibras musculares.

Finalmente, resta comparar os efeitos de transparência criados pela Glicerina a 50% e a Glucose a 40%. Para realizar tal comparação, devemos considerar as variações apresentadas para cada caso relativamente a todos os parâmetros estudados e também as possíveis explicações para algumas dessas variações. Por comparação entre os diversos tipos de dados, podemos concluir que o efeito criado pela Glicerina a 50% é de grandeza superior ao que foi descrito para a Glucose a 40%.

#### 4.3.4 Etileno Glicol 99%

O Etileno Glicol utilizado neste estudo apresenta uma concentração bastante elevada quando comparado com os agentes discutidos anteriormente. O seu pH e índice de refração encontram-se apresentados na tabela seguinte:

Tabela 45: Parâmetros do Etileno Glicol a 99%

<b>Parâmetros medidos no agente</b>	
<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
7.31 a 25°C	1.4280

Considerando os tecidos estudados com esta solução, calculamos a média dos seus parâmetros medidos antes do início do tratamento.



Tabela 46: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Etileno Glicol 99%

Parâmetros iniciais médios dos tecidos		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.13 g	6.38 a <24.1°C>	1.3980

Na figura seguinte encontra-se representada uma variação típica da transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99%:

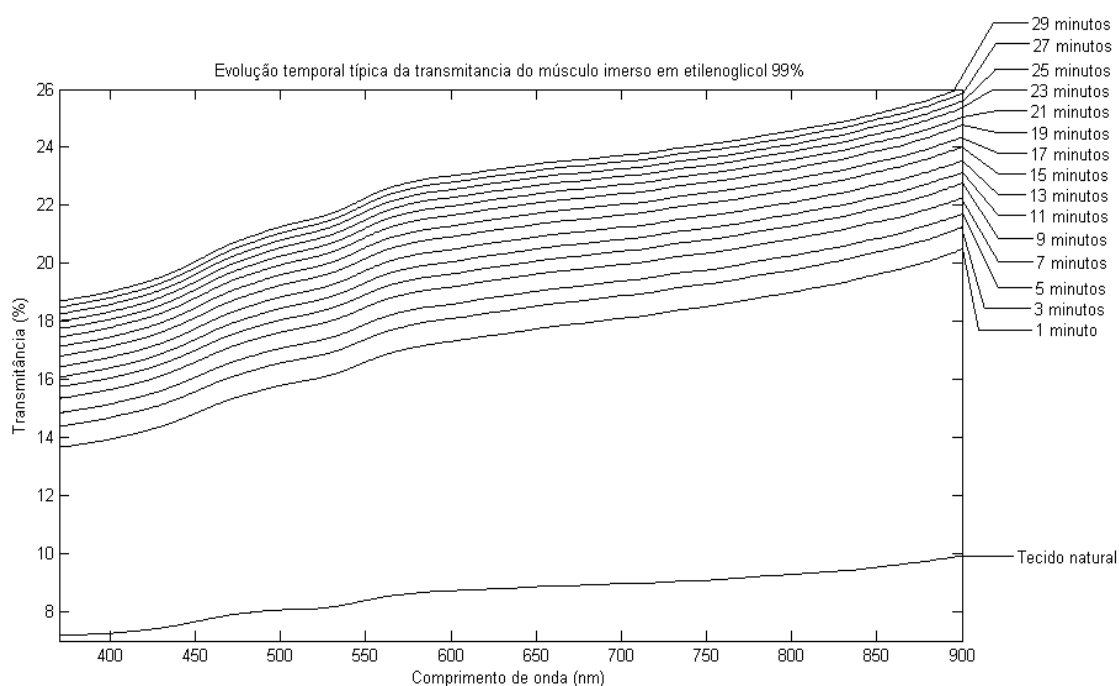


Figura 61: Evolução temporal típica do espectro de transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99%

Tal como nos casos anteriormente estudados, apresentamos aqui a evolução temporal típica da transmitância de um tecido para alguns comprimentos de onda ao longo do tempo de imersão no agente. Nesta representação podemos verificar que o regime de saturação é crescente e se prolonga durante um grande período de tempo. Este crescimento forte do regime de saturação está relacionado com a elevada concentração da solução utilizada.

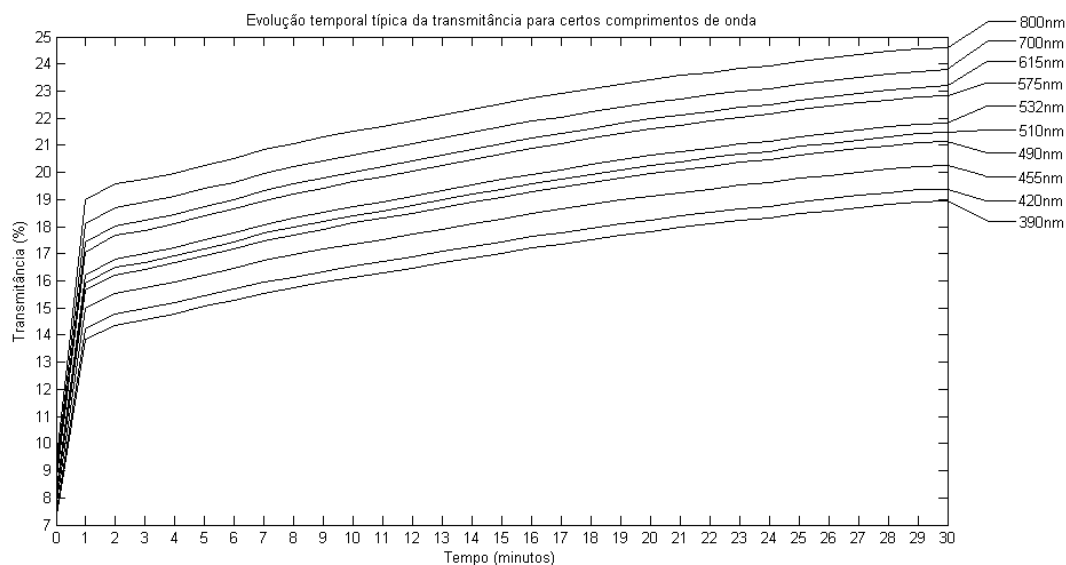


Figura 62: Evolução temporal típica da transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99%

Também para os 2 primeiros minutos de imersão fazemos este tipo de representação para verificação da ocorrência de oscilações na transmitância:

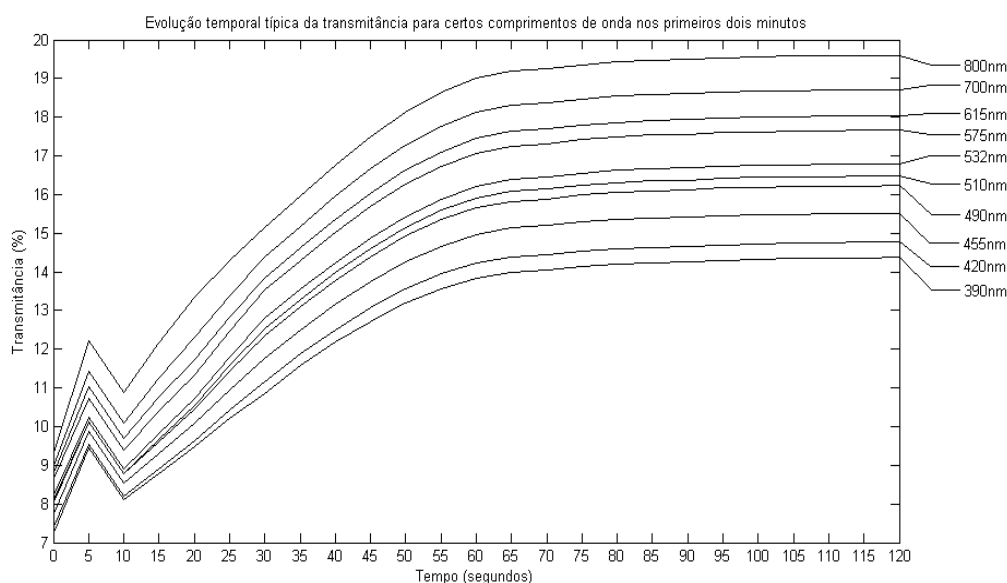


Figura 63: Evolução temporal típica da transmitância de um tecido imerso em Etileno Glicol 99% nos primeiros 2 minutos de tratamento

Conforme fizemos nos casos anteriores calculamos os espectros médios para cada instante de medição, normalizando em cada estudo experimental à transmitância natural do tecido para eliminar diferentes referências iniciais do efeito criado. A evolução

temporal media da transmitância para os comprimentos de onda habituais encontra-se representada na figura seguinte.

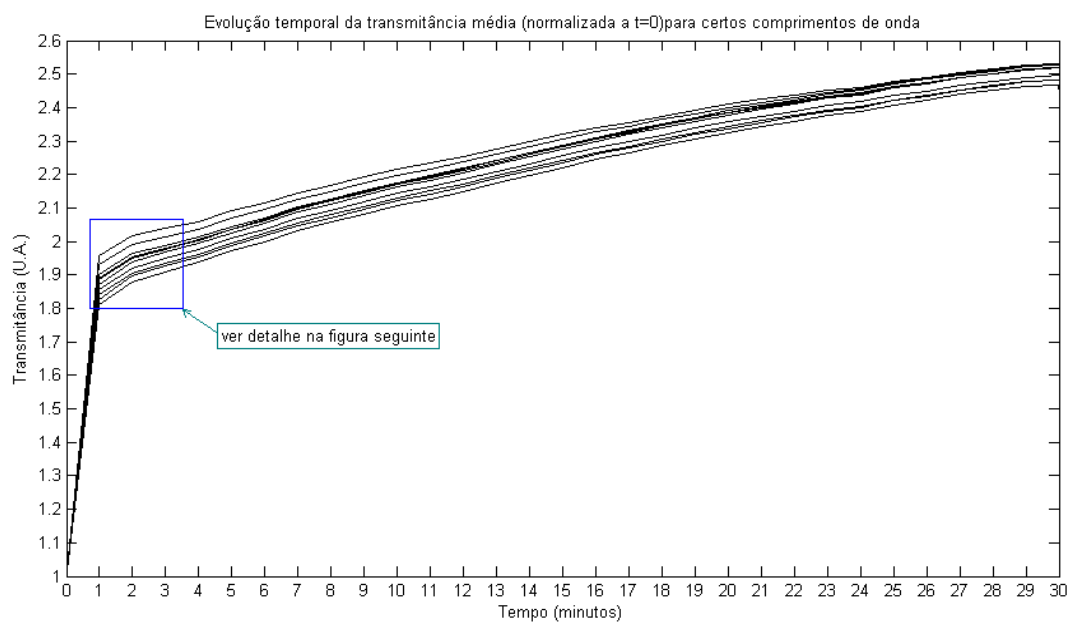


Figura 64: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Etileno Glicol 99%

Devido à longa escala de tempo, representamos na figura seguinte um detalhe da figura 64 para identificarmos as curvas de evolução temporal com os comprimentos de onda adoptados.

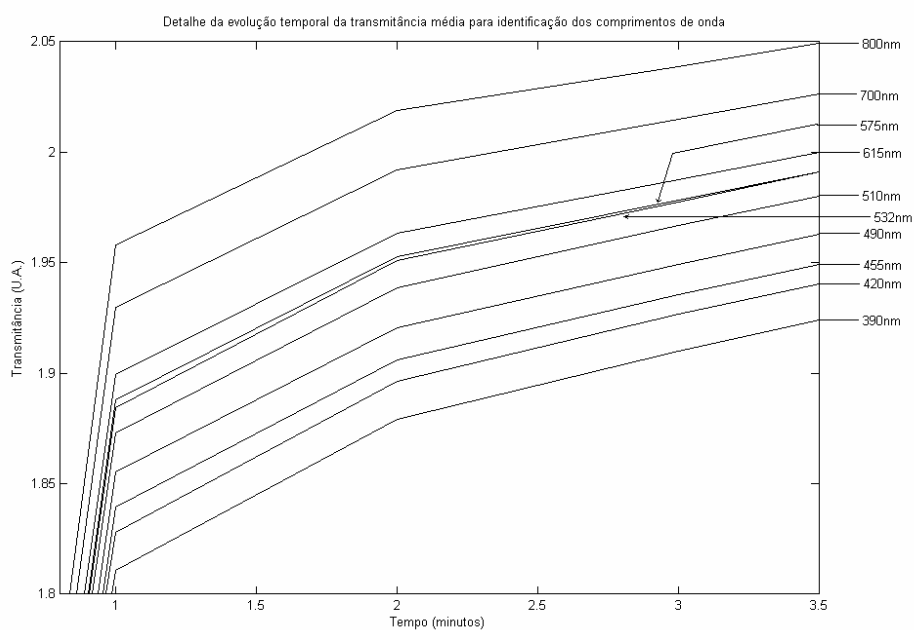


Figura 65: Detalhe da figura 64 para identificação das curvas com os comprimentos de onda adoptados

Verificamos na figura 64 um cruzamento de algumas linhas por volta dos 25 minutos de tratamento com o agente. Este facto indica uma variação na forma do espectro de transmitância. Tal pode estar relacionado com a elevada concentração do agente e consequente poder osmótico. Qualquer outro efeito estranho ficaria eliminado no cálculo da média da transmitância entre os 5 estudos. Na figura seguinte representamos a evolução média da transmitância calculada para os primeiros 2 minutos de tratamento:

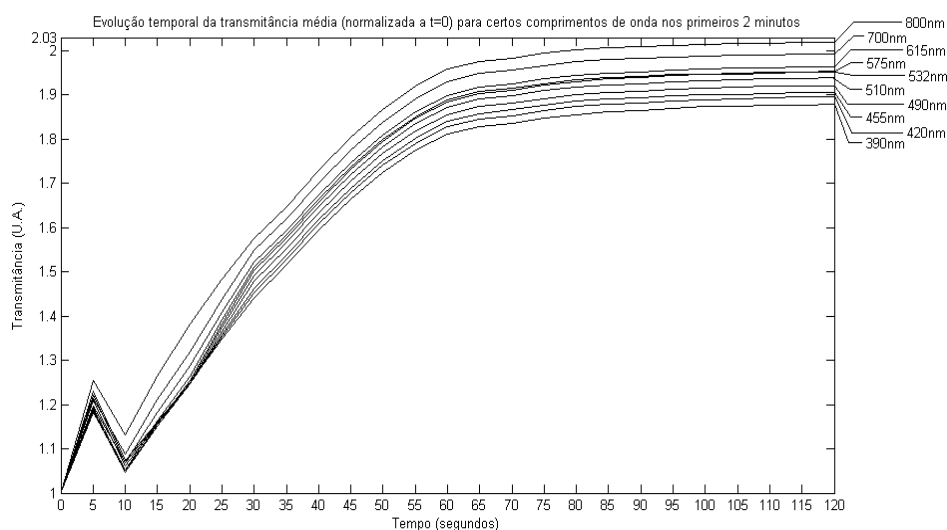


Figura 66: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Etileno Glicol 99% nos primeiros 2 minutos de tratamento

Verificamos a ocorrência das oscilações iniciais com um comportamento semelhante ao verificado para o caso da Glicerina a 50%, se bem que neste caso observamos níveis de transmitância relativamente superiores. As oscilações iniciais apresentam uma forma semelhante aos casos de Etileno e Glicerina nas diferentes concentrações estudadas e a sua explicação já foi apresentada. Nas duas figuras seguintes iremos apresentar as evoluções temporais do desvio padrão. A primeira considera todo o período de tratamentos osmótico e uma resolução temporal entre pontos medidos de 1 minuto, enquanto a segunda considera apenas os primeiros 2 minutos de tratamento e uma resolução temporal de 5 segundos entre medições consecutivas. Para os dois casos é feita a representação para os comprimentos de onda habituais.

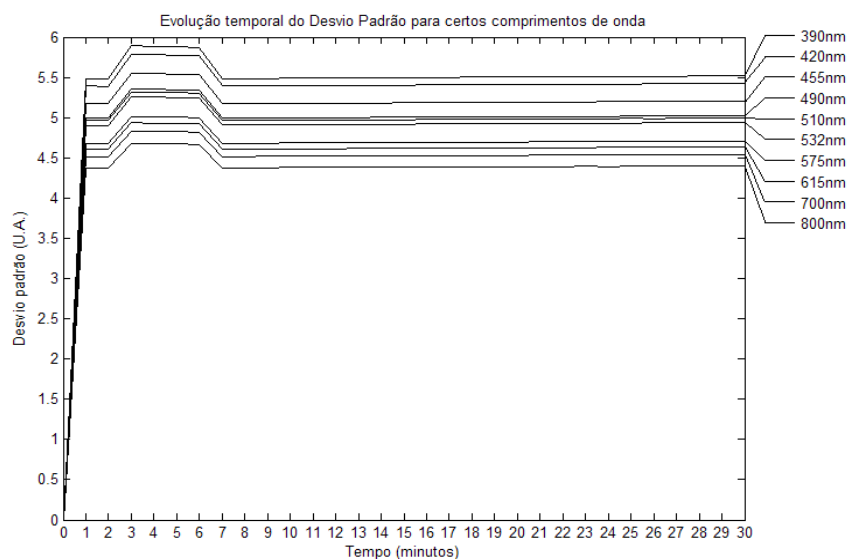


Figura 67: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Etileno Glicol 99%

Para os valores máximos observados na representação anterior, entre os 3 e os 6 minutos, podemos determinar o desvio padrão real. Nesse intervalo, determinamos um desvio padrão máximo real de  $\sim 12\%$  relativamente à média calculada. Embora este valor não seja preocupante, é significativo quando comparado com os obtidos nos casos anteriores.

Na figura 68 encontra-se representada a variação temporal do desvio padrão para os primeiros 2 minutos de tratamento.

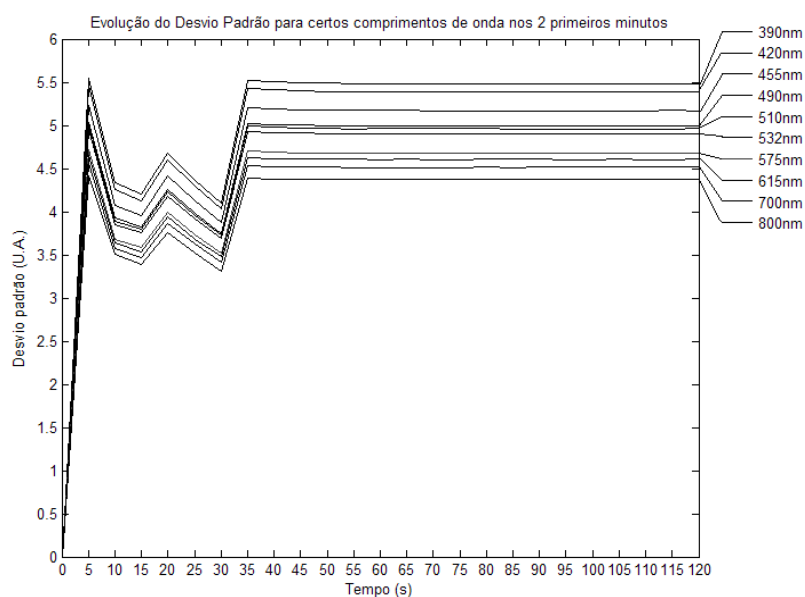


Figura 68: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Etileno Glicol 99%

Também para este caso, podemos determinar o desvio padrão máximo real observado neste intervalo de tempo. Assim, para o instante de tempo de 5 segundos, observamos um valor de 5.5% no gráfico anterior. Para este instante calculamos o valor de desvio padrão máximo real de 6.88%.

Finalmente, apresentamos a evolução temporal do espectro médio de transmitância para os tecidos estudados com o Etileno Glicol a 99%. Neste gráfico podemos identificar as bandas de absorção que ocorrem no infravermelho para as medições feitas a 5, 10, 15 20 e 25 segundos, tal como nos casos estudados anteriormente.

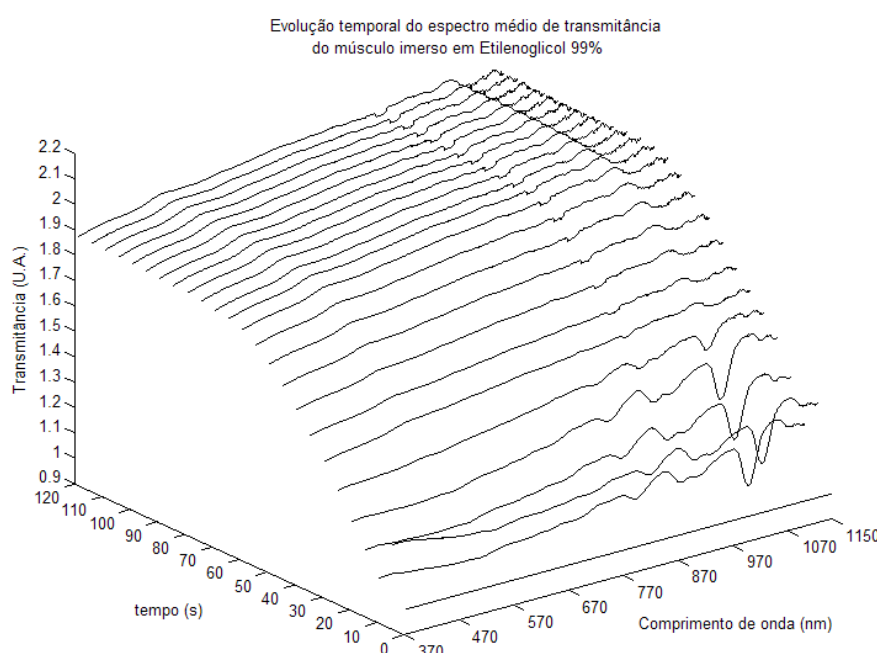


Figura 69: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Etileno Glicol 99% nos primeiros 2 minutos

Como os espectros médios ao longo do tempo foram calculados após a normalização relativamente à transmitância natural dos tecidos estudados, as bandas de absorção estão bem evidenciadas. A sua origem foi já discutida e merecem grande importância para futuros desenvolvimentos e na continuidade da investigação aqui descrita.

No final dos estudos ópticos, foram medidos os parâmetros finais dos tecidos para determinar as variações ocorridas devido ao tratamento aplicado. Os valores médios calculados para os 5 estudos experimentais relacionados encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 47: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Etileno Glicol 99%

<b>Parâmetros médios finais dos tecidos</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.10 g	6.04 a <24.46°C>	1.4240

Comparando os parâmetros finais com os iniciais, representados nas tabelas 46 e 47, verificamos que a massa sofreu, em média uma diminuição de 0.03 gramas, o pH diminuiu em média 0.34 (desprezando a pequena diferença de temperaturas médias consideradas) e o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4240. A perda de massa deve-se à perda de água que o tecido sofreu, assim como a diminuição do pH, visto que o pH da água é próximo de 7 à temperatura ambiente. O aumento do índice de refração do tecido é causado pela adaptação de índices que ocorre por difusão do agente para o espaço inter-fibras do tecido.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, do Etileno Glicol a 99% e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.87. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento a percentagem de agente no interior do tecido supera bastante a percentagem de água verificada para o tecido natural. Este facto implica o aumento de volume do tecido e/ou a compressão dos constituintes sólidos no interior do tecido.

Conforme fizemos nos casos anteriores, vamos avaliar as variações que ocorreram na espessura média dos tecidos, na disposição das fibras e na sua dimensão média devido ao tratamento aplicado. Iremos considerar as variações médias relativamente aos 5 estudos, embora apresentemos aqui fotografias de um estudo em particular. Iremos comparar também as variações determinadas para os tecidos do tipo O e do tipo H para detectar eventuais efeitos criados pela radiação óptica que atravessou os tecidos do grupo O.

Apresentamos de seguida as fotografias tiradas de um tecido tratado com Etileno Glicol 99%. Os diversos tecidos tratados com este agente nos 5 estudos experimentais foram analisados para calcular a espessura média e o número médio de fibras após tratamento osmótico. Tais valores encontram-se na tabela 48.

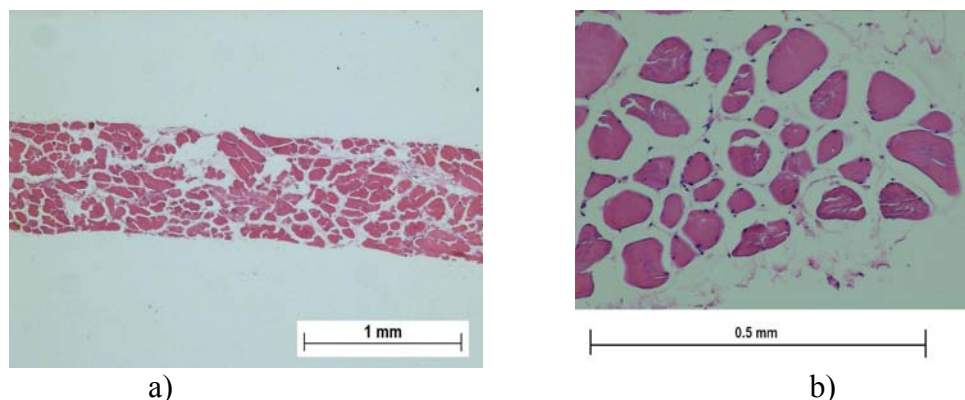


Figura 70: Fotografias de um tecido tratado com Etileno Glicol 99%: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x

Tabela 48: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Etileno Glicol a 99%

<b>Tratamento com Etileno Glicol a 99%</b>			
<b>Espessura média</b>		<b>Número médio de fibras musculares</b>	
<b>Grupo O</b>	<b>Grupo H</b>	<b>Grupo O</b>	<b>Grupo H</b>
0.655	0.652	29	27

Comparando as espessuras médias dos tecidos naturais (tabela 36) com os tecidos tratados com o Etileno Glicol a 99%, verificamos um aumento superior para os tecidos do grupo H, ao contrário do que tinha sido observado para a Glicerina a 50% e a Glucose a 40%. Os tecidos do grupo H sofrem um aumento da espessura média de 0.101 milímetros, enquanto que os do grupo O aumentam de 0.040 milímetros. Embora se verifique neste caso o oposto do que constatamos para a Glicerina e a Glucose, podemos apenas assumir que esta diferença nas variações de espessuras médias se deve à interacção da radiação óptica utilizada nos estudos ópticos com os tecidos, mas que de uma forma ou outra produziu um efeito oposto aos anteriormente descritos. À excepção da utilização de radiação óptica nos tecidos do grupo O, utilizaram-se os mesmos procedimentos para os tecidos dos dois grupos. Relativamente ao número médio de fibras por área da secção recta do tecido verificamos uma diminuição semelhante para os tecidos dos dois grupos.

Para caracterizarmos o efeito de transparência criado pelo Etileno Glicol a 99% podemos considerar que o efeito de transparência criado e observado opticamente é acompanhado de uma diminuição de massa e de pH. Estas variações demonstram a existência de desidratação e de difusão do agente para o espaço inter-fibras no interior



do tecido. O aumento verificado no índice de refração global do tecido com o tratamento explica o fenómeno de adaptação de índices de refração que ocorre no espaço inter-fibras. A diminuição do número de fibras por área de secção recta do tecido, assim como a diminuição visualizada dos seus diâmetros demonstram a inserção do agente para o interior do tecido e a pressão osmótica criada sobre as fibras musculares.

Finalmente, resta comparar os efeitos de transparência criados pela Glicerina a 50% e a Glucose a 40% com o efeito criado pelo Etileno Glicol a 99%. Para realizar tal comparação, devemos considerar as variações verificadas para cada caso relativamente a todos os parâmetros estudados e também as possíveis explicações para algumas dessas variações. Por comparação entre os diversos tipos de dados, podemos concluir que o efeito criado pelo Etileno Glicol a 99% é de grandeza superior ao que foi descrito para as duas outras soluções estudadas. Tal facto está certamente relacionado com a grande diferença verificada entre a concentração de Etileno Glicol e as concentrações de Glicerina e Glucose estudadas.

#### 4.3.5 Propileno Glicol

O Propileno Glicol é um líquido que se apresenta em estado puro. Antes de realizarmos os 5 estudos com este agente medimos os seus valores de pH e índice de refração:

Tabela 49: Parâmetros do Propileno Glicol

<b>Parâmetros medidos no agente</b>	
<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
6.52 a 25,4°C	1.4295

Considerando os tecidos tratados com esta solução nos diferentes estudos experimentais, calculamos a média dos seus parâmetros medidos antes do início do tratamento.

Tabela 50: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com Propileno Glicol

<b>Parâmetros iniciais do tecido</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.16 g	6.36 a <24.18°C>	1.3980

Na figura seguinte encontra-se representada uma variação típica do espectro de transmitância de um tecido imerso em Propileno Glicol:

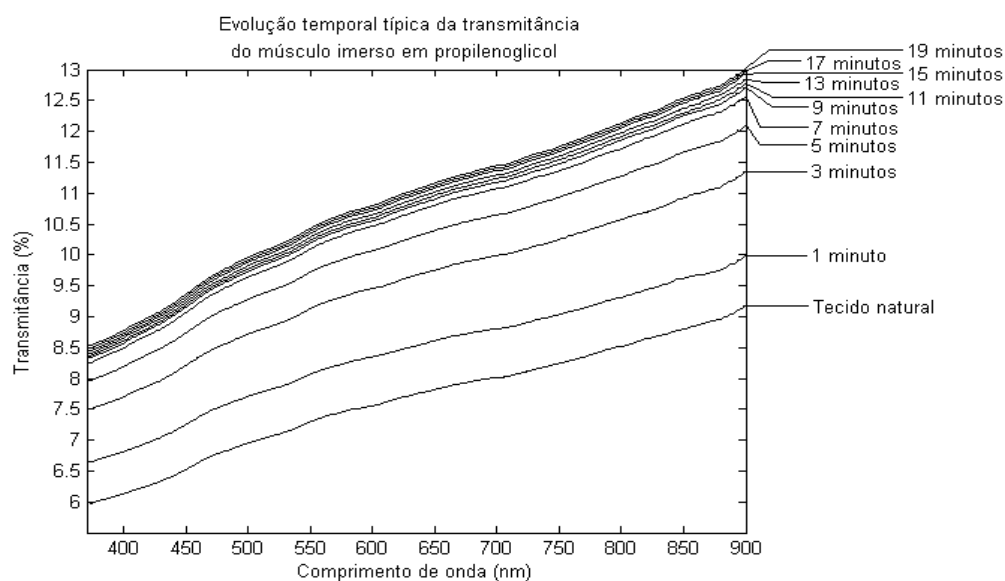


Figura 71: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso em Propileno Glicol

Para os comprimentos de onda considerados, apresentamos na figura seguinte a variação típica da transmitância durante o período de tratamento:

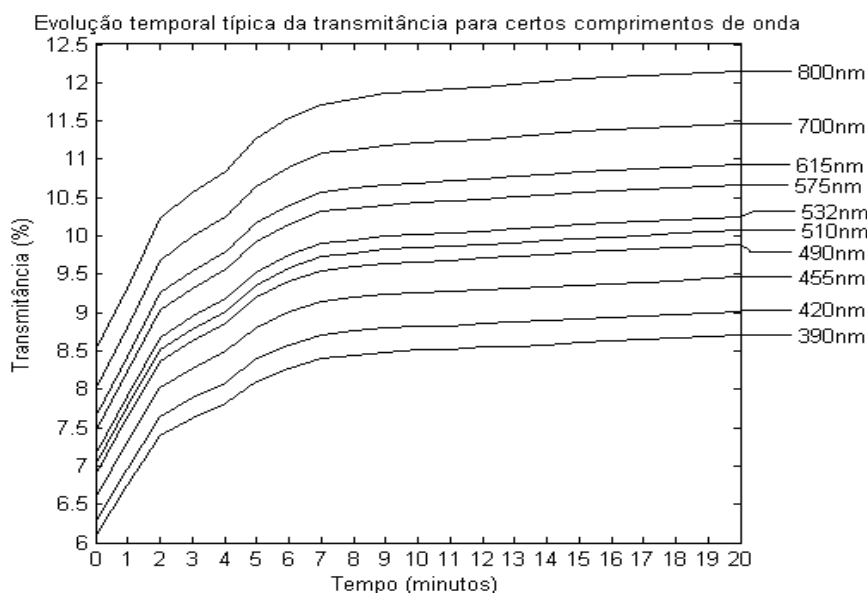


Figura 72: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Propileno Glicol

Também para os primeiros 2 minutos de tratamento, verificamos a ocorrência de oscilações iniciais para um estudo experimental típico:

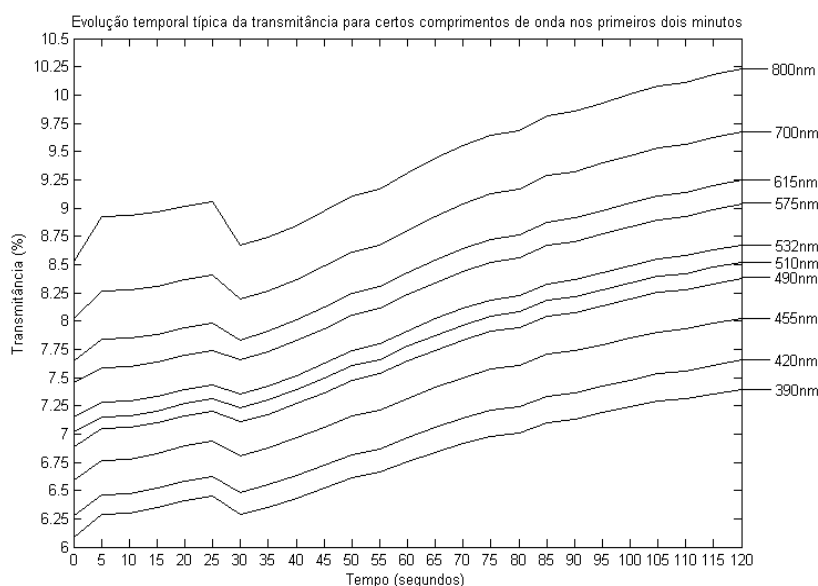


Figura 73: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso em Propileno Glicol nos primeiros 2 minutos de tratamento

A evolução da transmitância média calculada para os 5 estudos experimentais está representada na figura seguinte para os comprimentos de onda considerados e para o período total de imersão dos tecidos. Este gráfico apresenta uma resolução de 1 minuto.

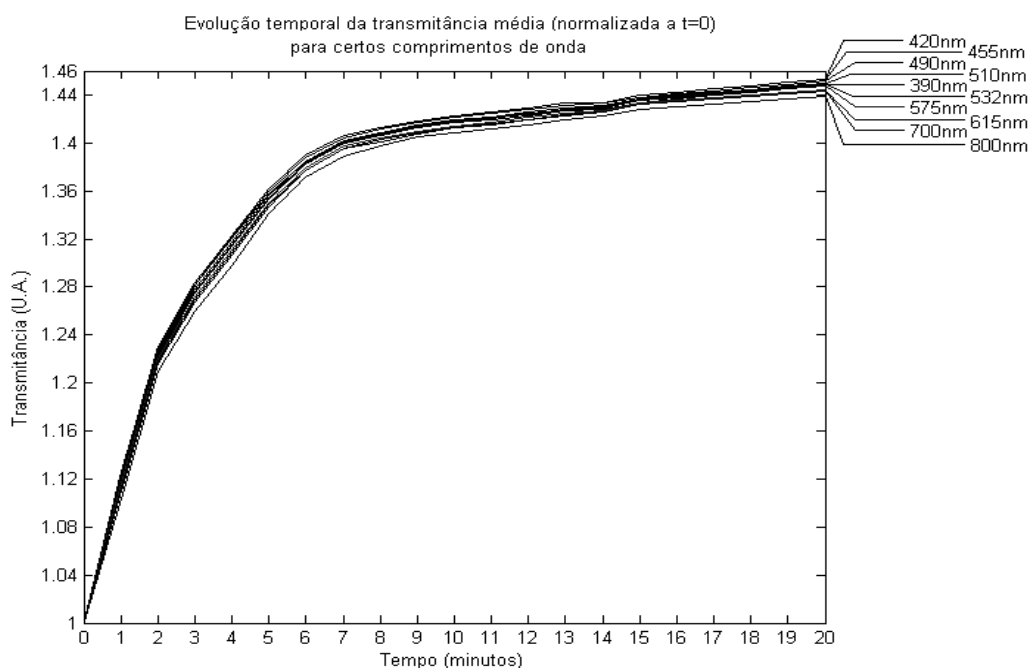


Figura 74: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Propileno Glicol

Relativamente aos primeiros 2 minutos de imersão dos tecidos apresentamos na figura seguinte a evolução da transmitância média para os comprimentos de onda considerados. Neste gráfico verificamos a resolução entre medições realizadas de 5 segundos:

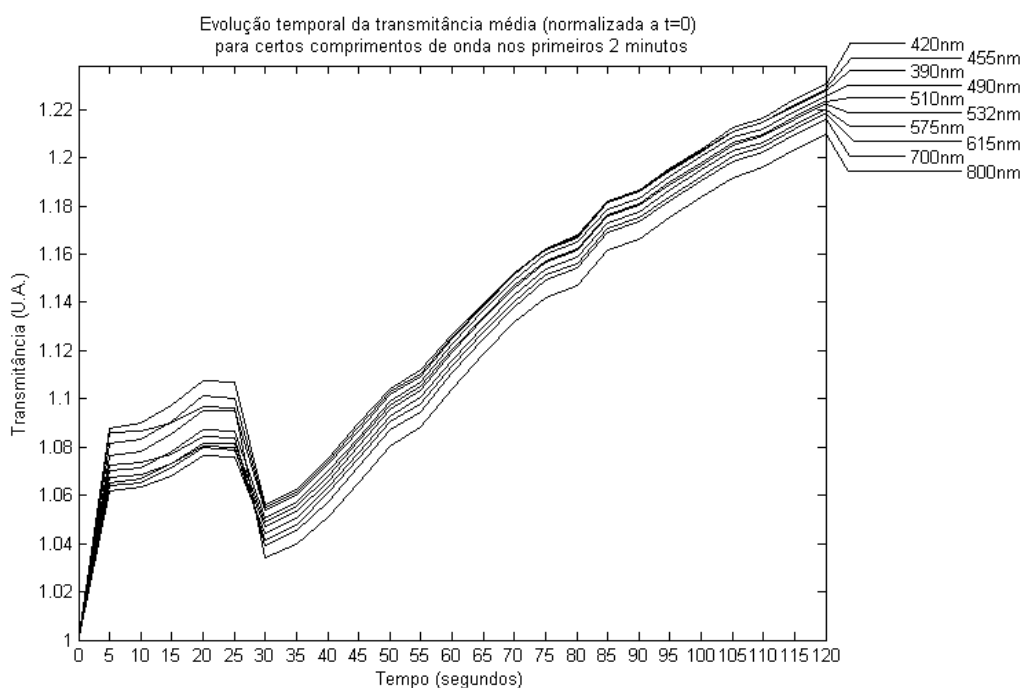


Figura 75: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos em Propileno Glicol nos primeiros 2 minutos de tratamento

Para esta representação da evolução média da transmitância durante os primeiros 2 minutos, verificamos que as oscilações existentes apresentam um comportamento idêntico ao que já foi apresentado e descrito no estudo da Glucose a 40%.

Nas duas figuras seguintes representamos as evoluções temporais do desvio padrão. A primeira considera todo o período de tratamento e uma resolução entre pontos medidos consecutivamente de 1 minuto, enquanto que na segunda se representam apenas os 2 primeiros minutos de imersão e uma resolução entre medições consecutivas de 5 segundos. Consideram-se nos dois casos os comprimentos de onda habituais.

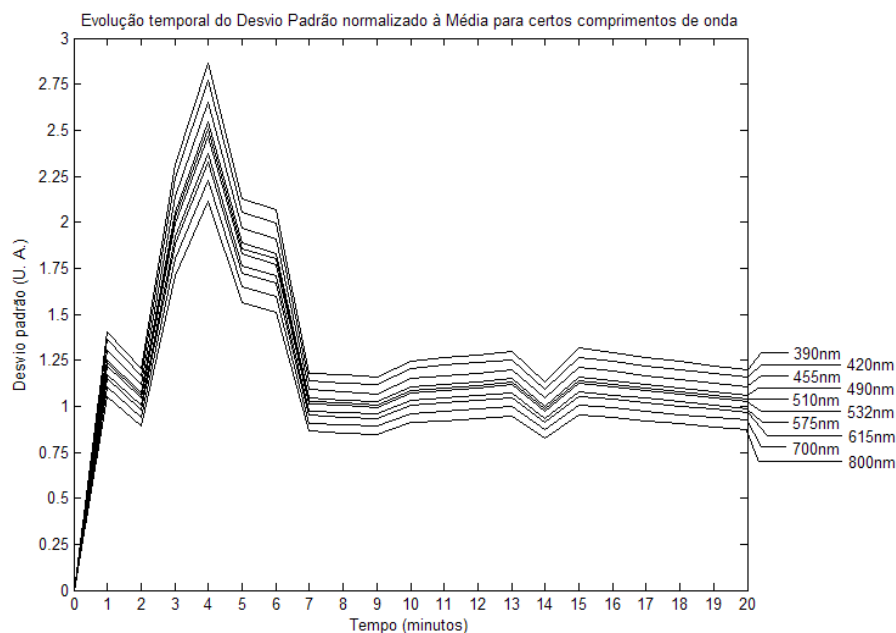


Figura 76: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com Propileno Glicol

Para os 4 minutos de imersão verifica-se um máximo no gráfico anterior. Multiplicando o valor observado de  $\sim 2.9$  pelo seu correspondente na figura 74, que é aproximadamente 1.32, obtemos um desvio padrão máximo real de  $\sim 3.83\%$ . Este valor não é significativo para a realização de 5 estudos. A figura seguinte apresenta a variação temporal do desvio padrão normalizado à média para os primeiros 2 minutos de tratamento.

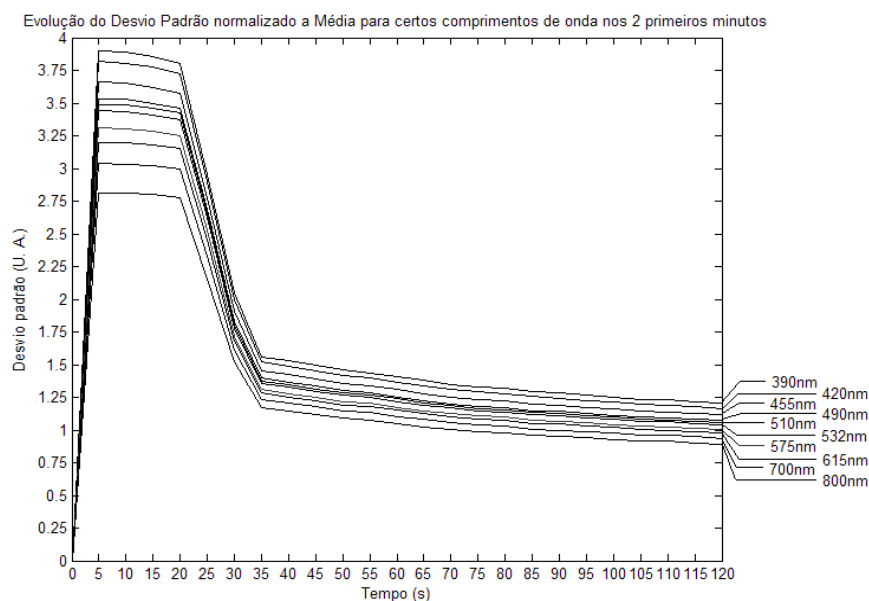


Figura 77: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com Propileno Glicol

Também aqui podemos determinar o valor real do desvio padrão para o máximo observado no gráfico anterior. Assim, para os 5 segundos de tratamento, temos um desvio padrão normalizado de  $\sim 3.9$ . Na figura 75, observamos para os 5 segundos de tratamento um valor máximo de 1.09. Desta forma, o desvio padrão real para este instante de medição será de 4.25%. Este valor não é significativo considerando os 5 estudos experimentais considerados.

Finalmente, apresentamos a evolução temporal do espectro médio de transmitância para os tecidos estudados com o Propileno Glicol, para identificação de eventuais bandas de absorção.

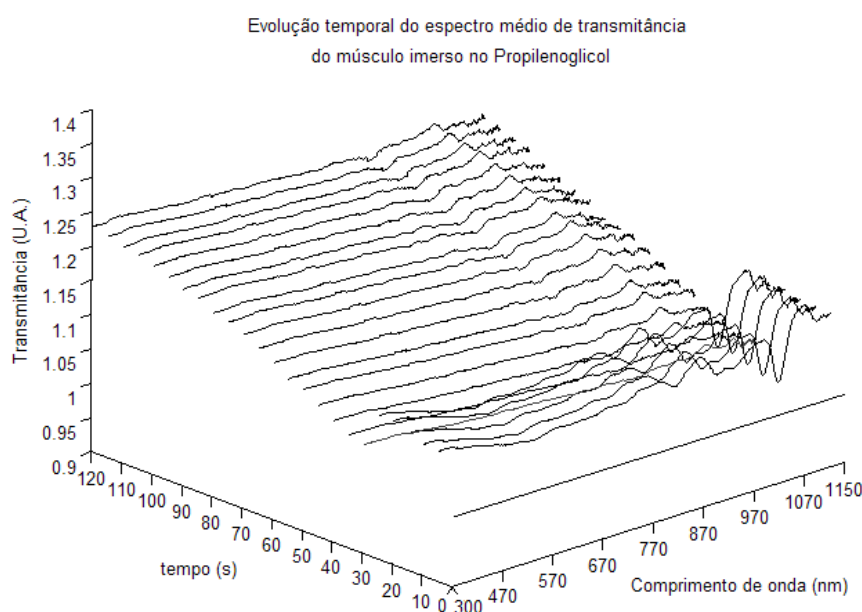


Figura 78: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos em Propileno Glicol médio nos primeiros 2 minutos

Tal como no caso da Glucose em solução com 40% de concentração, verificamos a alteração dos espectros medidos a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos. Tais alterações apresentam a criação de bandas de absorção na banda visível e no infravermelho. Como explicamos para o caso da Glucose a 40%, a criação destas bandas de absorção está relacionada com o movimento da água no interior do tecido para aqueles instantes de tempo. As bandas no infravermelho são bem evidentes, enquanto que as que ocorrem na zona do visível são menos pronunciadas.

No final do estudo óptico, foram medidos em cada estudo experimental, os parâmetros finais dos tecidos para determinar as variações ocorridas devido ao tratamento aplicado.

Os valores médios calculados para os 5 estudos experimentais relacionados encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 51: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com Propileno Glicol

<b>Parâmetros médios finais dos tecidos</b>		
<b>Massa</b>	<b>pH</b>	<b>Índice de Refracção</b>
0.12 g	6.04 a <24.58°C>	1.4150

Comparando os parâmetros finais com os iniciais, representados nas tabelas 50 e 51, verificamos que a massa sofreu em média uma diminuição de 0.04 gramas, o pH diminuiu em média 0.32 (desprezando a pequena diferença de temperaturas médias consideradas) e o índice de refração aumentou de 1.3980 para 1.4150. A perda de massa deve-se à perda de água que o tecido sofreu, assim como a diminuição do pH, visto que o pH da água é próximo de 7 à temperatura ambiente. O aumento do índice de refração do tecido é causado pela adaptação de índices que ocorre por difusão do agente para o espaço inter-fibras do tecido.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, do Propileno Glicol e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.54. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o tecido deve conter ainda uma percentagem de água considerável no seu interior.

Vamos agora quantificar as variações de espessura do tecido, da disposição das fibras e da sua dimensão média devido ao tratamento aplicado. Iremos considerar as variações médias relativamente aos 5 estudos, embora apresentemos aqui fotografias de um estudo em particular. Iremos também comparar os efeitos histológicos entre os tecidos dos grupos O e H para detectar eventuais efeitos criados pela radiação óptica que atravessou os tecidos do grupo O.

Apresentamos de seguida as fotografias tiradas de um tecido tratado com Propileno Glicol. Este tecido e os dos restantes estudos experimentais com este agente foram analisados para calcular a espessura média e do número médio de fibras após tratamento osmótico. Tais valores encontram-se na tabela 52.

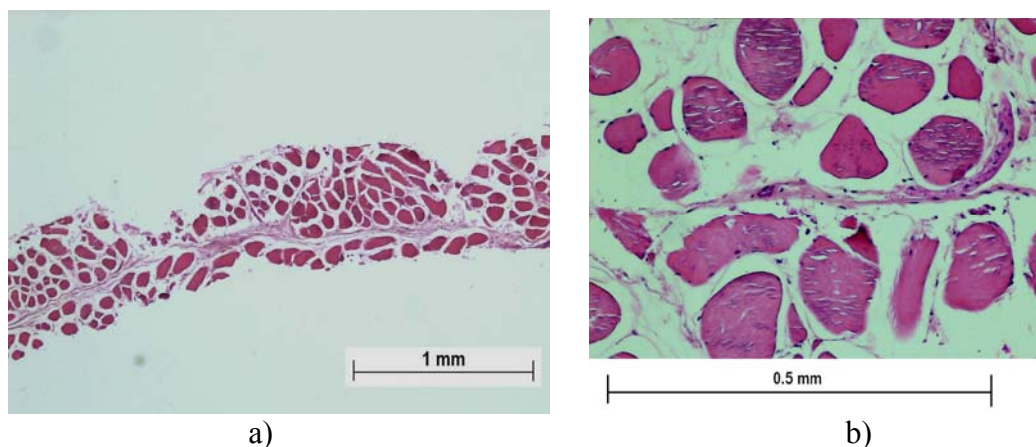


Figura 79: Fotografias de um tecido tratado com Propileno Glicol: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x

Tabela 52: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com Propileno Glicol

Tratamento com Propileno Glicol			
Espessura média		Número médio de fibras musculares	
Grupo O	Grupo H	Grupo O	Grupo H
0.706	0.753	32	37

Por comparação entre as espessuras médias dos tecidos naturais (tabela 36) e dos tecidos tratados com o Propileno Glicol, verificamos um aumento maior para os tecidos do grupo H, tal como se verificou no caso do Etileno Glicol a 99%. Os tecidos do grupo H sofrem um aumento da espessura média de 0.202 milímetros, enquanto que os do grupo O aumentam de 0.091 milímetros. Esta diferença na variação de espessuras para os tecidos dos dois grupos é certamente causada pela radiação, pelo que mais uma vez se demonstra a ocorrência de diferenças entre os tecidos dos dois grupos. Relativamente ao número médio de fibras por área da secção recta do tecido verificamos uma diminuição superior para os tecidos do grupo O, que pode também estar relacionada com a interacção da radiação óptica com as fibras e fluidos intersticiais.

Para caracterizarmos o efeito de transparência criado pelo Propileno Glicol podemos considerar que o efeito de transparência criado e observado opticamente é acompanhado de uma diminuição de massa e de pH. Estas variações demonstram a existência de desidratação e de difusão do agente para o espaço inter-fibras no interior do tecido. O aumento verificado no índice de refração global do tecido com o tratamento explica o fenómeno de adaptação de índices de refração que ocorre no espaço inter-fibras. A



diminuição do número de fibras por área de secção recta do tecido, assim como a diminuição visualizada dos seus diâmetros demonstram a inserção do agente para o interior do tecido e a pressão osmótica criada sobre as fibras musculares.

Finalmente, resta comparar os efeitos de transparência criados pelos diversos agentes estudados anteriormente com o efeito criado pelo Propileno Glicol. Nesta comparação vamos considerar as variações verificadas para cada caso relativamente a todos os parâmetros estudados. Desta forma, podemos concluir que o efeito criado pelo Propileno Glicol é inferior aos efeitos criados pelos restantes agentes estudados no mesmo intervalo de tempo relativamente às medições ópticas realizadas. Quanto aos restantes parâmetros este agente apresenta variações semelhantes, embora a redução do número de fibras musculares por área da secção recta dos tecidos seja algo inferior aos demais casos já apresentados.

#### 4.3.6 Solução de Etanol + Glicerina + Água destilada nas proporções 1:1:2

Esta última solução osmótica é um composto de Etanol com Glicerina e Água destilada, que foi preparada nas proporções 1:1:2. O pH e o índice de refração desta solução foram medidos e encontram-se representados na tabela seguinte:

Tabela 53: Parâmetros da solução de Etanol+Glicerina+ Água destilada

Parâmetros medidos no agente	
pH	Índice de Refracção
7.61 a 25,2°C	1.3805

Considerando os tecidos tratados com esta solução nos diferentes estudos experimentais, calculamos a média dos seus parâmetros medidos antes do início do tratamento.

Tabela 54: Parâmetros iniciais médios dos tecidos a tratar com a Mistura

Parâmetros iniciais do tecido		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.14 g	6.34 a <24.12°C>	1.3980

Na figura seguinte encontra-se representada uma variação típica do espectro de transmitância de um tecido imerso nesta mistura:

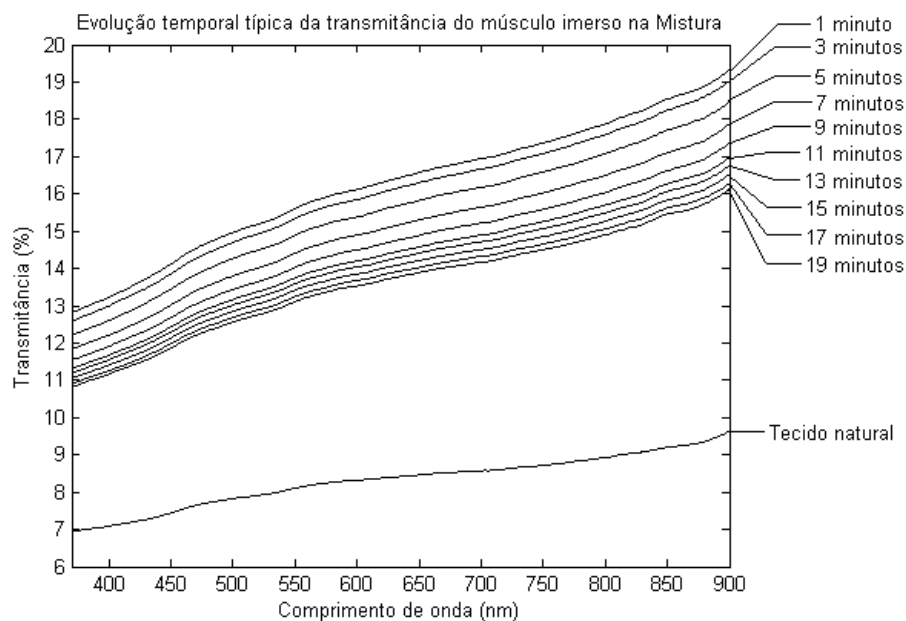


Figura 80: Evolução temporal típica do espectro de transmitância do tecido imerso na Mistura

Para os comprimentos de onda considerados, apresentamos nas duas figuras seguintes a evolução típica da transmitância do tecido imerso na solução. Primeiro para o tempo total de tratamento com uma resolução de 1 minuto entre pontos medidos e depois para os primeiros dois minutos com uma resolução de 5 segundos entre medições.

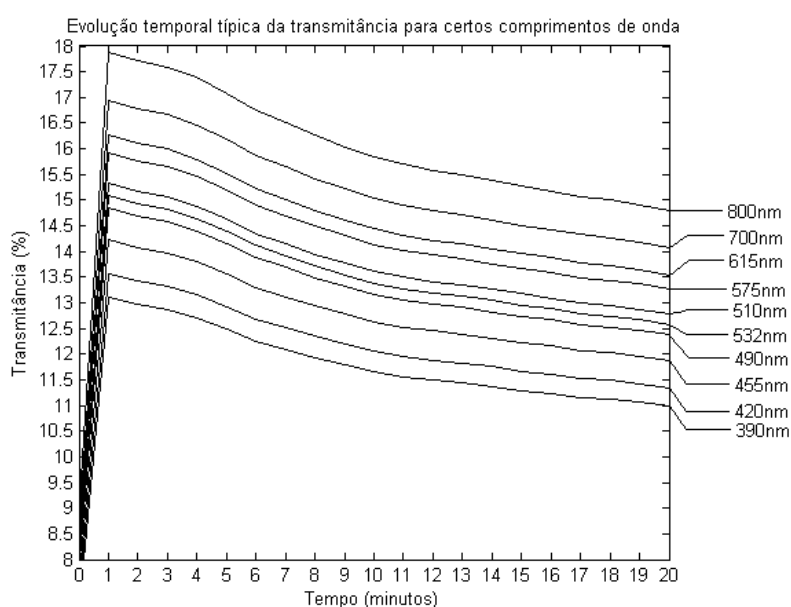


Figura 81: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso na Mistura

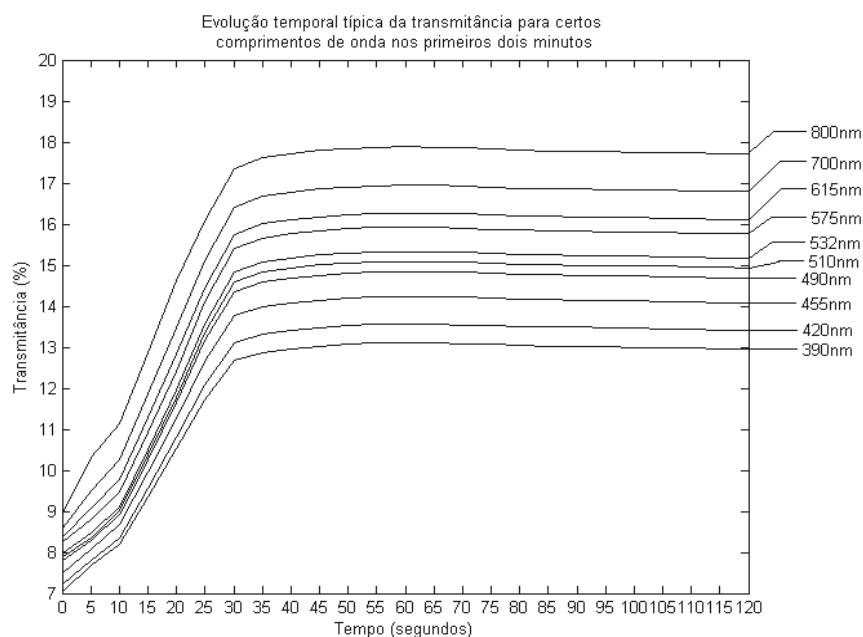


Figura 82: Evolução temporal típica da transmitância do tecido imerso na Mistura nos primeiros 2 minutos de tratamento

Nesta representação podemos observar a falta de oscilações semelhantes às que ocorreram para a Glicerina ou Glucose, por exemplo, ou de tipo diferente. Ocorre uma mudança na evolução da transmitância ao fim de 10 segundos de tratamento, mas a tendência é sempre crescente. Isto demonstra que os constituintes sólidos do tecido não chegam a agrupar-se fortemente para provocar um bloqueio da radiação. Isto pode dever-se à presença de água na Mistura. Na figura seguinte, apresentamos a variação temporal média para a transmitância nos comprimentos de onda habituais.

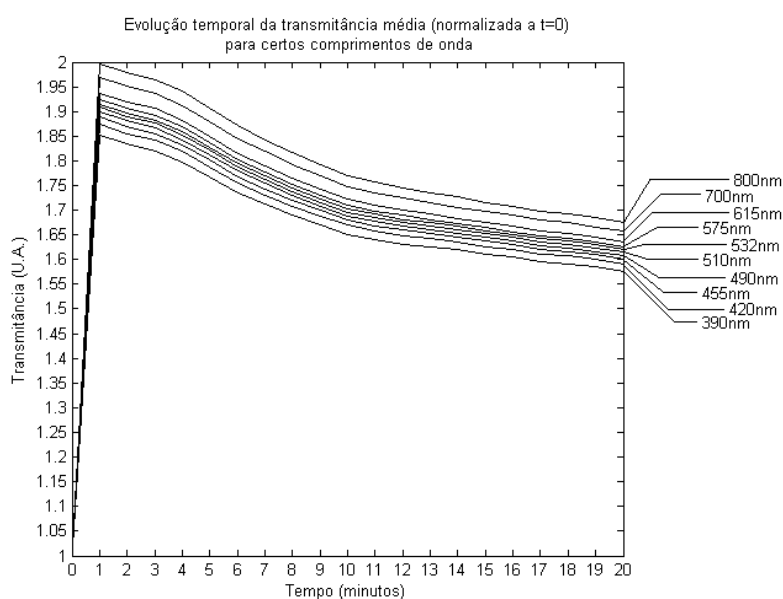


Figura 83: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos na Mistura

Podemos observar que a transmitância aumenta fortemente para o primeiro minuto de tratamento e depois diminui de forma suave até entrar no regime de saturação que começa a partir dos 11 minutos de tratamento. Este efeito é rápido para aumentar a transmitância para valores duplos. Posteriormente já na fase decrescente apresenta um comportamento bastante alargado no tempo. No entanto a tendência é para estabilizar a transmitância com valores algo superiores à transmitância natural. Isto é tanto mais forte, quanto maior for o comprimento de onda considerado, o que potencia este agente para aplicações terapêuticas, cujos comprimentos de onda se localizam entre os 600 nm e o infravermelho.

Na figura seguinte, representamos o comportamento médio dos 5 estudos realizados para o intervalo inicial de 2 minutos.

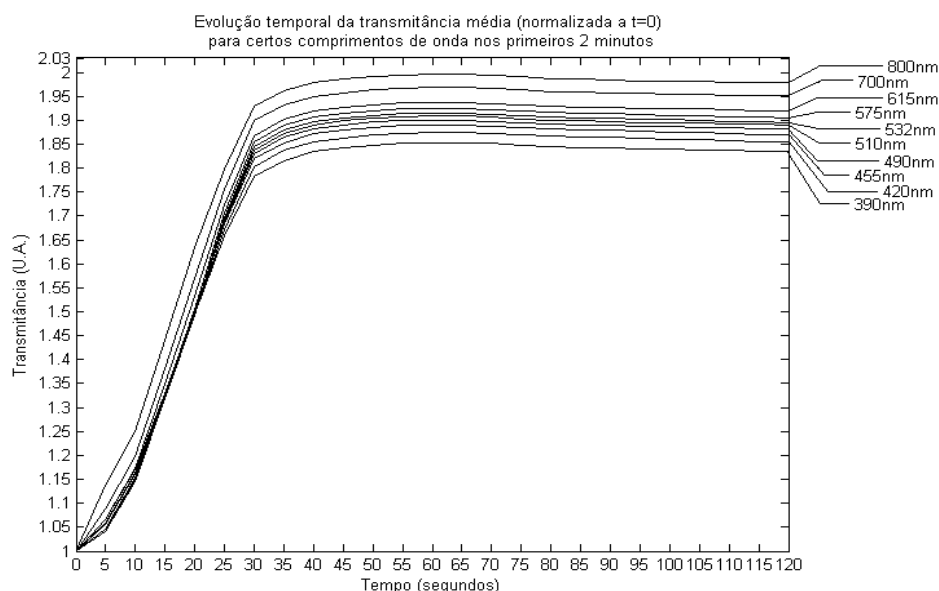


Figura 84: Evolução temporal da transmitância média dos tecidos imersos na Mistura nos primeiros 2 minutos de tratamento

Como podemos confirmar pela figura anterior, não há ocorrência de quaisquer oscilações neste período de tempo. A transmitância média apresenta sempre uma tendência crescente durante os 30 segundos iniciais e desde esse instante até os 2 minutos inverte a tendência de forma bastante suave.

A representação da evolução do desvio padrão normalizado à média calculada apresenta uma forma curiosa. Até aos 10 minutos de tratamento a sua variação é semelhante à que observamos para a média da transmitância. No entanto, após os 10 minutos o seu comportamento é algo bizarro conforme podemos verificar pela figura 85:

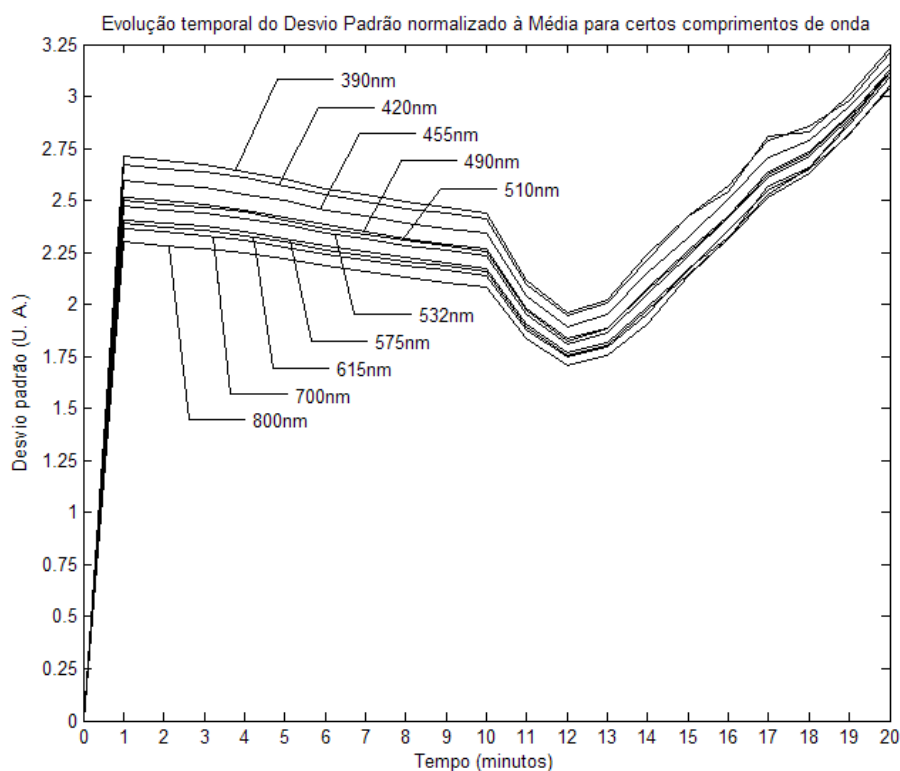


Figura 85: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média para os estudos com a Mistura

Para o último minuto representado na figura anterior verifica-se um máximo absoluto do desvio padrão normalizado à média. Vamos determinar para este instante de tempo o desvio padrão real relativamente à média calculada. Multiplicando o valor observado de 3.25 pelo seu correspondente na figura 83, que é aproximadamente 1.675, obtemos um desvio padrão máximo real de 5.44%. Este valor não é significativo para a realização de 5 estudos.

Para a representação da evolução temporal do desvio padrão normalizado à média calculada durante os primeiros 2 minutos, observamos um comportamento melhor do que o do gráfico anterior. No entanto ainda ocorrem algumas oscilações que estão ligadas às mudanças de tendência observadas no gráfico da figura 84. Algumas dessas mudanças de tendência evolutiva no tempo são demasiadamente pequenas que se tornam praticamente imperceptíveis na representação da figura 84. No entanto, existem e a sua prova é a representação seguinte:

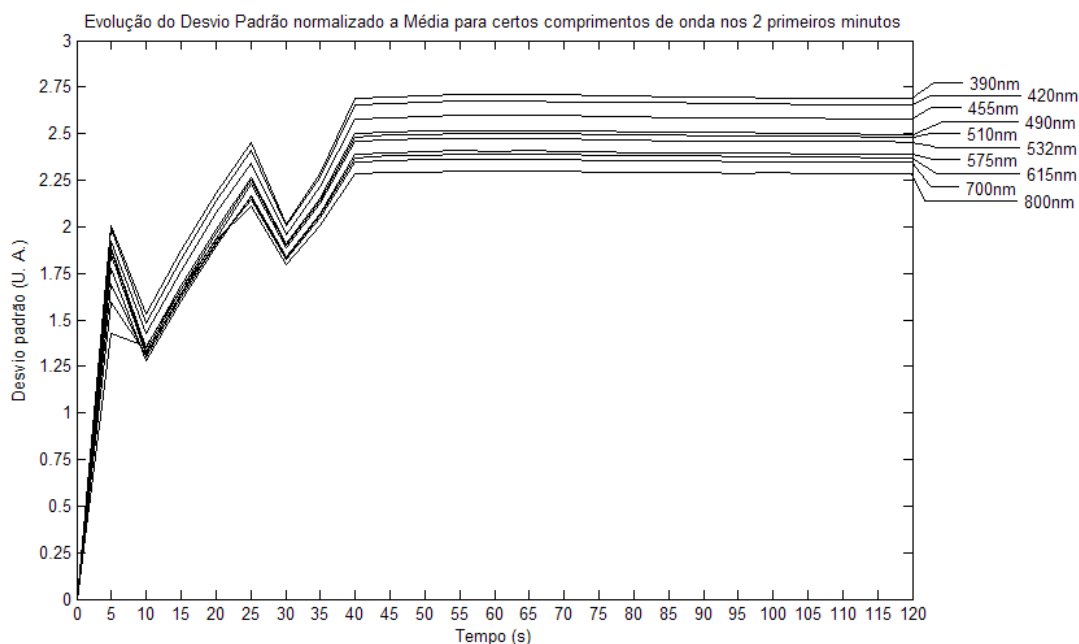


Figura 86: Evolução temporal do desvio padrão normalizado em relação à média nos primeiros 2 minutos de tratamento para os estudos com a Mistura

Verificamos pela representação anterior que os valores máximos ocorrem desde os 45 segundos de tratamento até aos 120 segundos. O valor máximo neste período de tempo é de aproximadamente 2.75 para o comprimento de onda de 390 nm. Para o mesmo intervalo de tempo na figura 84, verifica-se a ocorrência de valor máximo no intervalo temporal de 60 a 65 segundos. Para o mesmo comprimento de onda, o valor máximo na figura 84 é aproximadamente 1.85. Assim o valor máximo para o desvio padrão real é de 5.09%, que não é significativo para os 5 estudos experimentais realizados.

Finalmente, apresentamos a evolução temporal do espectro médio de transmitância para os tecidos estudados com a Mistura. Nesta representação verificamos a ocorrência de bandas de absorção nos espectros medidos a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos do tratamento osmótico aplicado. Este fenómeno ocorre sempre independentemente do agente em solução que estudamos. Estas bandas de absorção tornam-se mais evidentes devido à normalização aplicada aos espectros representados na figura 87, que elimina a forma espectral da transmitância do tecido natural.

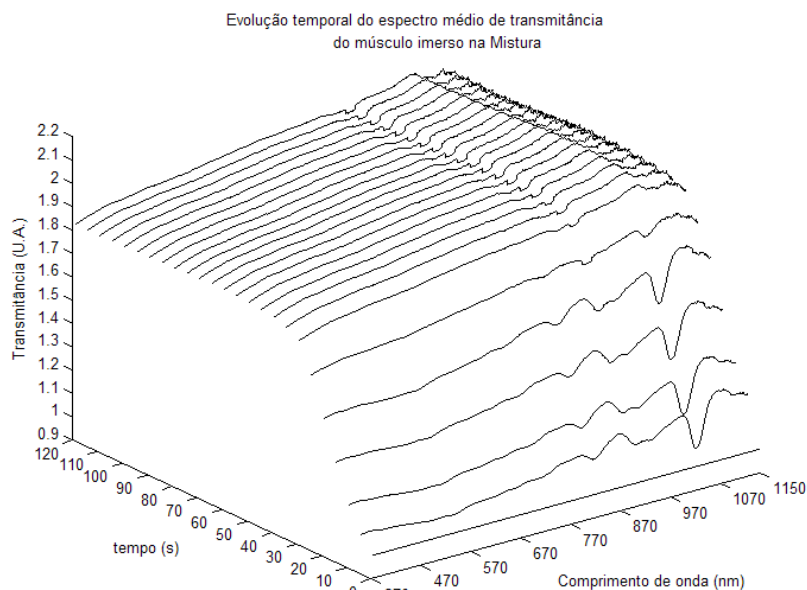


Figura 87: Evolução do espectro de transmitância médio dos tecidos imersos na Mistura médio nos primeiros 2 minutos

Como a transmitância média representada na figura anterior para o primeiro minuto é sempre crescente, torna-se mais simples de visualizar as bandas de absorção do que nas representações feitas nos restantes casos estudados. Considerando a escala de comprimentos de onda, as duas primeiras bandas de absorção apresentam uma intensidade pequena, mas a última é bastante acentuada. Como estas bandas apenas ocorrem nas medições feitas a 5, 10, 15, 20 e 25 segundos estão certamente relacionadas com o fluxo de líquidos no interior dos tecidos. É espantoso, como para todos os casos estudados, a ocorrência das bandas de absorção é sempre nos mesmos instantes de tempo identificando o período de tempo em que ocorrem os fluxos referentes à desidratação.

No final do estudo óptico, foram medidos em cada estudo experimental, os parâmetros finais dos tecidos para determinar as variações ocorridas devido ao tratamento aplicado. Os valores médios calculados para os 5 estudos experimentais relacionados encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 55: Parâmetros finais médios dos tecidos tratados com a Mistura

Parâmetros médios finais dos tecidos		
Massa	pH	Índice de Refracção
0.11 g	6.01 a <24.54°C>	1.3855

Comparando os parâmetros finais com os iniciais, representados nas tabelas 54 e 55, verificamos que a massa sofreu em média uma diminuição de 0.03 gramas, o pH diminuiu em média 0.33 (desprezando a pequena diferença de temperaturas médias consideradas) e o índice de refração diminuiu de 1.3980 para 1.3855. A perda de massa deve-se à perda de água que o tecido sofreu, assim como a diminuição do pH, visto que o pH da água é próximo de 7 à temperatura ambiente. A diminuição do índice de refração do tecido é causada pela adaptação de índices que ocorre por difusão do agente para o espaço inter-fibras do tecido.

Conhecidos os valores para os índices de refração do tecido natural, da Solução de Etanol com Glicerina e Água destilada e do tecido tratado por este agente, a fracção em volume do agente no interior do tecido é estimada pela equação 16, resultando o valor de 0.71. Comparando este valor estimado com o valor da fracção de água presente no tecido natural (0.77), verificamos que após o tratamento o agente encontra-se em percentagem ligeiramente inferior à que a água apresentava no tecido natural. No entanto, devemos considerar que o agente em si contém 50% de água destilada na sua composição e assim a quantidade de água no interior do tecido tratado deve ser elevada. Finalmente vamos estudar as variações de espessura do tecido, da disposição das fibras e da sua dimensão média devido ao tratamento aplicado. As fotografias apresentadas na figura seguinte foram tiradas de um tecido tratado com esta solução. Todos os tecidos utilizados nos estudos experimentais com este agente foram analisados para calcular a espessura média e do número médio de fibras após tratamento osmótico. Tais valores encontram-se na tabela 56.

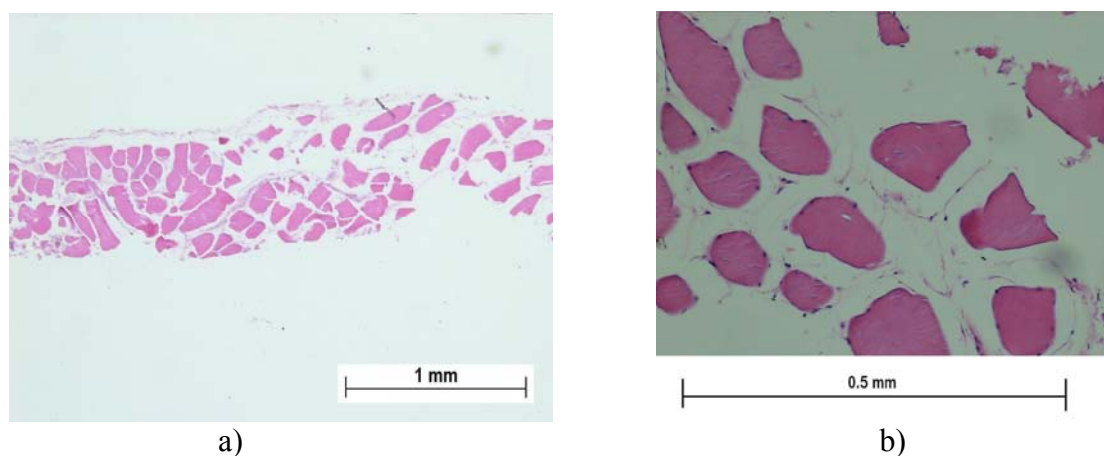


Figura 88: Fotografias de um tecido tratado com a Mistura: a) com ampliação de 2x e b) com ampliação de 10x



Tabela 56: Espessura média e número médio de fibras musculares para os tecidos tratados com a Mistura

<b>Tratamento com a Mistura</b>			
<b>Espessura média</b>		<b>Número médio de fibras musculares</b>	
<b>Grupo O</b>	<b>Grupo H</b>	<b>Grupo O</b>	<b>Grupo H</b>
0.606	0.816	32	31

Por comparação entre as espessuras médias dos tecidos naturais (tabela 36) e dos tecidos tratados com esta solução, verificamos para os tecidos do grupo H um aumento bastante grande enquanto que para os tecidos do grupo O se verifica uma pequena redução. Esta diferença na variação de espessuras para os tecidos dos dois grupos é certamente causada pela radiação, pelo que mais uma vez se demonstra a ocorrência de diferenças entre os tecidos dos dois grupos. Relativamente ao número médio de fibras por área da secção recta do tecido verificamos uma diminuição semelhante para os dois grupos de tecidos considerados.

Para caracterizarmos o efeito de transparência criado por esta solução podemos considerar que o efeito de transparência criado e observado opticamente é acompanhado de uma diminuição de massa e de pH semelhantes às observadas para os demais casos estudados. Estas variações demonstram a existência de desidratação e de difusão do agente para o espaço inter-fibras no interior do tecido. O aumento verificado no índice de refração global do tecido com o tratamento explica o fenómeno de adaptação de índices de refração que ocorre no espaço inter-fibras. A diminuição do número de fibras por área de secção recta do tecido, assim como a diminuição visualizada dos seus diâmetros demonstram a inserção do agente para o interior do tecido e a pressão osmótica criada sobre as fibras musculares. Por outro lado, devemos considerar a elevada proporção de água que esta solução contém. Esta água irá substituir em parte a água que saiu do tecido devido à desidratação inicialmente estimulada. Como vimos para o caso da Glicerina a 50% o efeito maior em termos de aumento de transmitância ocorre no início do período de tratamento. Na solução utilizada neste caso, temos também Glicerina que estimula o aumento inicial da transmitância verificado opticamente. Nos instantes posteriores do tratamento, a água assume o papel mais importante por se encontrar em maioria na solução. Como consequência, observamos a diminuição acentuada na transmitância após o primeiro minuto de tratamento.

Comparando o efeito criado por esta solução com os efeitos criados pelos outros agentes estudados, podemos dizer que a solução de Etanol com Glicerina e Água destilada apresenta um aumento bastante forte no primeiro minuto de tratamento, ao qual apenas o Etileno Glicol a 99% se aproxima. No entanto após os 60 segundos de tratamento, o efeito é fortemente decrescente devido à forte presença de água na solução. Relativamente à variação dos parâmetros médios considerados, esta solução apresenta variações semelhantes às verificadas nos restantes casos. Importa aqui salientar a aplicabilidade deste agente para aplicações clínicas em que seja necessário criar o efeito de transparência de forma rápida e que seja necessário apenas numa curta duração de tempo. Algumas aplicações de diagnóstico, como por exemplo o Fotodiagnóstico poderão beneficiar com a criação de um efeito de transparência deste tipo.

## **Capítulo 5. Conclusões e Perspectivas Futuras**

## **5 Conclusões e perspectivas futuras**

Após termos terminado os diversos estudos experimentais e depois de processada a informação, estamos em condições de fazer uma análise à qualidade dos resultados obtidos e de identificar certas dificuldades experimentais para decidir quais os caminhos necessários para o futuro progresso desta linha de investigação. Certos tipos de desenvolvimentos que possam ser realizados como consequência do trabalho desenvolvido e potenciais aplicações que a análise dos diferentes efeitos de transparência estudados possam originar serão também discutidos.

### **5.1 Interpretação de resultados obtidos e Conclusões**

A actualidade e importância dos efeitos de transparência criados por agentes osmóticos em materiais biológicos, levou-nos a realizar um estudo de caracterização dos seus efeitos no músculo da parede abdominal do rato. Verificamos inicialmente que dois grupos de estudos diferentes poderiam proporcionar informação variada com grande importância clínica para futuros desenvolvimentos.

#### **5.1.1 Estudo de agentes com diferentes concentrações**

Assim consideramos um primeiro estudo em que se adoptou uma metodologia para investigar como variava o efeito de transparência criado nos tecidos em função da concentração do agente em solução. Neste caso foram estudadas soluções de Etileno Glicol e Glicerina com concentrações de 50%, 75% e 87%, em solução aquosa. Pela análise, não só, dos efeitos ópticos criados, mas também das variações ocorridas para a massa, pH e índice de refração dos tecidos, assim como da variação de certos parâmetros histológicos que ocorrem por difusão das soluções osmóticas no tecido, verificamos ser possível caracterizar os efeitos de transparência para cada um dos casos estudados e possibilitar a comparação entre efeitos criados por agentes diferentes. Esta análise levou-nos a concluir que na generalidade os efeitos ópticos criados são acompanhados pela diminuição da massa e do pH medidos para o tecido como um todo, assim como do aumento do índice de refração global do tecido por desidratação e adaptação de índices de refração entre os constituintes sólidos e o fluido intersticial. O aumento da transmitância dos tecidos com o tratamento osmótico aplicado leva também

ao aumento de espessura média do tecido, à diminuição do número de fibras musculares por unidade de área da secção recta do tecido e a uma diminuição do diâmetro médio destas fibras, que avaliamos apenas de forma visual. Este tipo de variações foi verificado para todos os tecidos tratados com as soluções em diferentes concentrações de Etileno Glicol e Glicerina.

Para todas as soluções destes dois agentes que estudamos, verifica-se a ocorrência de oscilações iniciais na evolução temporal da transmitância do tecido submetido a tratamento. Estas oscilações são do mesmo tipo para os dois agentes e diferentes concentrações estudados e ocorrem durante os primeiros 10 segundos de tratamento. Esta ocorrência de oscilações traduz a existência de desidratação dos tecidos devido à pressão criada pelo agente sobre a água localizada nos espaços intersticiais do tecido. A diminuição da transmitância verificada para todos os casos entre 5 e 10 segundos, mostra que os constituintes sólidos se aproximam e bloqueiam mais a passagem da radiação óptica. Essa aproximação é facultada pela saída de água dos espaços entre os constituintes sólidos. Após estas oscilações iniciais, a transmitância passa por alguns regimes distintos ao longo do tempo. Esses regimes são distintos para as diferentes concentrações estudadas, mas tem sempre o mesmo significado. Após a diminuição da transmitância que referimos ocorrer entre 5 e 10 segundos, a transmitância apresenta um crescimento rápido que ocorre entre os 10 e os 60 segundos. Este crescimento rápido está associado à adaptação de índices de refração que ocorre por inserção do agente osmótico por difusão, entre os constituintes sólidos. Este crescimento é rápido e forte devido ao espaço livre deixado pela água e também pela grande diferença de concentrações do agente entre o exterior e o interior do tecido.

Posteriormente, entre o primeiro e o segundo minuto de tratamento por imersão, o crescimento da transmitância é menos acentuado, acusando a maior dificuldade que o agente sente em se difundir para o interior. Este menor crescimento da transmitância deve-se ao aumento de concentração do agente no interior do tecido, o que reduz a pressão osmótica criada do exterior para o interior.

Após o 2º minuto de imersão, a evolução da transmitância no tempo passa a ser diferente consoante a concentração do agente, embora apresente grande semelhança para as soluções de Etileno Glicol e Glicerina de igual concentração. No caso das soluções de concentração 50%, ocorre uma diminuição suave a partir do 2º minuto, que se prolonga até os 6 a 7 minutos de tratamento. Após esse instante a transmitância entra em regime linear de saturação, que para a concentração de 50% é ligeiramente

decrecente. No caso das soluções com concentração 75%, o período de diminuição suave ocorre apenas no caso da solução de Etileno Glicol, entre os 2 e os 3 minutos e de forma muito reduzida. No caso da Glicerina 75% não existe. A partir dos 3 minutos de tratamento, inicia o regime linear de saturação que é agora crescente, mostrando que o agente continua a difundir-se para o interior do tecido. Esta difusão, pode estar relacionada com a compressão das fibras musculares que verificamos existir pela redução dos diâmetros aparentes nas fotografias em corte dos tecidos tratados. O caso das soluções de concentração 87% é em tudo semelhante ao das soluções com concentração de 75%, embora o regime linear de saturação comece agora a partir do 2º minuto nos dois casos estudados e o seu crescimento seja mais acentuado.

Os níveis de transmitância que se verificam no final do período de medição são consideravelmente superiores aos verificados para o tecido natural. Para as soluções com 50% de concentração, a transmitância atinge níveis quase duplos dos verificados naturalmente. Este aumento na transmitância para períodos de 15 minutos ocorre de forma semelhante para todos os comprimentos de onda considerados nas representações feitas.

Adicionalmente, verificou-se em todos os casos estudados, a ocorrência de bandas de absorção nos espectros medidos nos instantes de tempo de 5, 10, 15, 20 e 25 segundos. Estas bandas de absorção localizam-se na zona espectral do infravermelho e podem estar relacionadas com o processo de desidratação dos tecidos visto que ocorrem apenas nos instantes iniciais do tratamento.

Para estabelecermos uma relação de dependência entre a concentração do agente em solução e o efeito de transparência por ele criado, comparamos as variações verificadas para os casos estudados com soluções do mesmo agente em diferentes concentrações, tanto no caso do Etileno Glicol como no caso da Glicerina. Quer para um agente, quer para o outro, se verifica que o aumento da concentração em solução aquosa proporciona a criação de efeitos de transparência mais fortes. Com o aumento da concentração, verifica-se também a ocorrência de maiores variações na diminuição de massa e de pH e do aumento do índice de refração global do tecido. Por outro lado, a espessura do tecido aumenta mais e o diâmetro médio das fibras musculares diminui mais nos casos de tecidos tratados com soluções de maior concentração de Etileno Glicol ou Glicerina. Desta forma podemos afirmar que o efeito de transparência criado cresce com o aumento da concentração de agente utilizado em solução aquosa.

Finalmente, resta fazer uma comparação entre os efeitos criados pelos dois agentes, verificando-se que os efeitos de transparência são superiores quando se aplica a Glicerina. Os resultados verificados nesta análise estimulam novas linhas de investigação, como veremos na secção seguinte. Para todas as soluções estudadas fizemos uma estimativa da fracção de agente que se difundiu para o interior dos tecidos durante o tratamento, verificando que ela é tanto maior, quanto maior for a concentração de agente aplicado.

### **5.1.2 Estudo comparativo entre efeitos criados por diferentes agentes**

No segundo tipo de investigação experimental realizado, passamos a estudar agentes osmóticos de diferente natureza para caracterizar os efeitos por eles criados no mesmo tipo de tecido e posteriormente fizemos comparações entre efeitos e avaliamos as suas potencialidades de aplicação em situações clínicas em que as tecnologias ópticas são utilizadas. Neste caso, foram realizados 5 estudos independentes para cada tipo de agente, para podermos calcular as variações médias devido aos tratamentos aplicados. Escolhemos novamente uma solução de Glicerina a 50% e de Etileno Glicol, mas agora numa concentração de 99%. Foram também estudados a Glucose em solução com concentração de 40%, o Propileno Glicol no seu estado puro e uma última solução contendo Etanol, Glicerina e Água Destilada nas proporções de 1:1:2, que designamos por Mistura. Para este tipo de estudo, foram considerados dois grupos de tecidos: os tecidos do grupo O são tratados por imersão nos agentes osmóticos e estudados opticamente fazendo-se atravessar pela radiação óptica, enquanto que os tecidos do grupo H são apenas tratados pelos agentes em imersão, não se introduzindo radiação no seu interior. Desta forma, pretendemos comparar as variações histológicas entre os tecidos dos dois grupos para discriminar se a radiação óptica terá algum efeito nos tecidos ou no efeito óptico criado. O método experimental adoptado para os tecidos do grupo O foi idêntico ao utilizado no estudo descrito na secção anterior, tendo-se agora adicionado os cálculos de evoluções médias temporais e respectivos desvios padrão para avaliar a dispersão entre estudos experimentais correspondentes relativamente à média calculada. Em termos temporais de variação da transmitância espectral óptica, verificam-se valores máximos de desvio padrão na ordem dos 6 a 7% para todos os tipos de agentes estudados, à excepção da Glicerina a 50%, em que se verificam valores de 32%, demonstrando grande dispersão de dados entre os 5 estudos realizados com

este agente. Foi também caracterizado o tecido natural em termos de parâmetros histológicos, em termos de índices de refração e fracções volumétricas parcelares dos dois tipos de constituintes do tecido: constituintes sólidos e fluido intersticial. Esta caracterização foi realizada para posterior cálculo das variações ocorridas devido aos tratamentos aplicados com cada agente. Após o cálculo das variações médias dos diferentes parâmetros, verifica-se na generalidade que o aumento da transmitância espectral óptica dos tecidos durante o tratamento por imersão é acompanhado pelo aumento do índice de refração global do tecido, da diminuição da massa e também do pH. As variações ocorridas a nível histológico foram também comparadas entre cada caso e o tecido natural, para avaliar de quanto variaram devido ao tratamento e possivelmente devido à inserção da radiação óptica no interior dos tecidos do grupo O. Verificam-se variações semelhantes entre os tecidos do grupo H e os tecidos do grupo O, embora sejam de magnitude diferente, o que indica efeitos causados pela interacção da radiação óptica com o tecido. Este efeito adicional verificado nos tecidos atravessados pela radiação óptica pode ser devido a um aumento de temperatura na zona experimental, proporcionado pela óptica instrumental que entrega o feixe de radiação óptica ao tecido e pelo longo período de iluminação. Para ambos os grupos de tecidos se verifica que o tratamento aplicado provoca o aumento da espessura da amostra, a diminuição do número de fibras por área do corte do tecido e também da diminuição do seu diâmetro médio. Todas estas variações que caracterizam o efeito temporário de transparência são verificadas para todos os agentes utilizados, embora apresentem diferentes ordens de magnitude entre os casos. Finalmente, com uma grande cadência inicial nas medições ópticas, foi possível identificar oscilações iniciais na transmitância para 4 dos 5 agentes estudados devido ao processo de desidratação dos tecidos. Tais oscilações são de um tipo para as soluções de Glicerina e de Etileno Glicol e de outro para a solução de Glucose e para o Propileno Glicol. No caso da Mistura, não se verificam tais oscilações. Os dois tipos de comportamento foram explicados de acordo com a teoria da difusão dos agentes osmóticos e com o processo de desidratação. Note-se que estas oscilações iniciais foram também identificadas e explicadas no primeiro tipo de estudo experimental em que se utilizaram as diferentes concentrações de Etileno Glicol e Glicerina.

Os efeitos de transparência apresentam grandezas diferentes consoante o agente utilizado. Estas grandezas poderão ser consideradas na criação de aplicações clínicas de utilização destes agentes. Para os períodos de tempo de medição considerados



verificamos os seguintes aumentos (aproximados) na transmitância dos tecidos relativamente ao estado natural: Glicerina 50% - 1.7, Glucose 40% - 1.7, Etileno Glicol 99% - 2.5, Propileno Glicol - 1.44 e Mistura - 1.6. Em face destes resultados e conhecendo-se os parâmetros envolvidos nos procedimentos clínicos que utilizam as tecnologias ópticas, como por exemplo a profundidade de actuação de um feixe laser cirúrgico ou as intensidades de fluorescência recebidas de uma profundidade fixa para a criação de uma imagem de diagnóstico, poderemos quantificar os progressos que poderão ser conseguidos com a criação de efeitos de transparência temporária por intermédio da aplicação dos agentes estudados.

Finalmente, pudemos verificar em todos os casos estudados que os espectros de transmitância sofrem alterações na sua forma nos instantes iniciais. Estas alterações espectrais ocorrem apenas nos instantes de medição de 5, 10, 15, 20 e 25 segundos de imersão dos tecidos e consistem na criação de bandas de absorção espectral com picos centrais localizados já no infravermelho. Trata-se do mesmo fenómeno observado no estudo das diferentes concentrações de Etileno Glicol e Glicerina. Dada a localização central destas bandas de absorção e o intervalo temporal para a sua ocorrência, pressupomos que poderão ser assinaturas espectrais do movimento da água dentro do tecido durante o processo de desidratação. Este fenómeno poderá ser futuramente explorado e até refinada a sua medição experimental para quantificar a água envolvida no processo de desidratação que é estimulada nos tecidos por cada tipo de agente osmótico utilizado. Para todos os agentes fizemos uma estimativa da fracção de agente que se difundiu para o interior dos tecidos durante o tratamento, verificando que este valor varia de caso para caso devido ao agente utilizado.

## **5.2 Perspectivas futuras de investigação e aplicação dos agentes estudados**

Uma vez concluído o estudo experimental e tendo obtido os resultados que apresentamos, pretendemos agora considerar certos aspectos observados, de forma crítica para delinear quais as necessidades de melhoramento que o presente trabalho proporciona.

Desta forma, começamos por considerar as alterações espectrais verificadas para todos os agentes osmóticos utilizados nos instantes iniciais dos tratamentos aplicados. É nossa suspeita de que se tratam de bandas de absorção causadas pelo fluxo de água correspondente à desidratação pela qual passa o tecido. Para obtermos uma confirmação

de que assim é, torna-se necessário realizar algumas tarefas de vital importância. Em primeiro lugar, precisamos de conseguir uma amostra de água do musculo da parede abdominal do rato e construir uma montagem experimental que permita medir a sua transmitância. Com esse espectro de transmitância poderemos comparar com os espectros obtidos neste trabalho para verificar se há concordância nos valores de comprimento de onda centrais das bandas de absorção. Se não corresponderem a bandas de absorção da água, teremos que caracterizar as bandas observadas e identificar por que motivo surgem no período de tempo inicial do tratamento. Uma vez concluída a identificação destas bandas, sejam elas correspondentes ao fluxo de água ou não, iremos implementar um método experimental que nos possibilite retirar informação quantificável a partir destas bandas, visto que elas ocorrem sempre nos instantes iniciais de tratamento, independentemente do agente aplicado. Poderemos associar a largura das bandas e a sua intensidade com a grandeza do fenómeno que as origina e poderá ser também possível descrever matematicamente a sua evolução no pequeno intervalo de tempo em que ocorrem.

Considerando, a dependência entre a concentração do agente e a grandeza do efeito óptico criado, pretendemos melhorar a técnica experimental adoptada para melhor descrever os efeitos de transparência temporal em função das variações de concentração do agente aplicado. Se possível, esperamos desenvolver um modelo teórico que nos permita estabelecer uma relação matemática entre a concentração do agente aplicado e a grandeza do efeito por ele criado. A criação deste modelo teórico será suportada com estudos experimentais adicionais e servirá no final para descrever situações de ajuste de concentração do agente em função da situação clínica em que se pretende criar um efeito de transparência. Outros estudos serão feitos mais tarde, em que consideraremos diferentes agentes osmóticos como o DMSO, o Polietileno Glicol, contrastantes de radiologia ou certos tipos de Gel dermatológico como o Aloé Vera e os resultados obtidos servirão para fazer correcções ao modelo teórico desenvolvido.

Outra área de investigação complementar que nos merece interesse, dá seguimento aos estudos de desidratação de um tecido natural que realizamos para caracterizar os constituintes internos em termos de índice de refração e fracções volumétricas. O estudo que anteriormente apresentamos não foi difícil de implementar, visto que o único fenómeno aplicado ao tecido foi a desidratação. Com um estudo semelhante realizado em tecidos que se encontrem submetidos à desidratação e ao tratamento osmótico em simultâneo, poderemos obter informações que permitem discriminar entre os dois

processos dinâmicos que ocorrem dentro do tecido biológico, a desidratação e a adaptação de índices de refração. Teremos que desenhar a forma de realização experimental deste estudo. Com este tipo de informação estaremos em condições de conhecer mais em detalhe como se processa o efeito temporário de transparência que é criado no interior do tecido, assim como de justificar as variações que o tecido sofre com o tratamento em termos de dimensões, pH, índice de refração e a nível histológico. Note-se que uma descrição com todo este tipo de informação é mais completa do que a que apresentamos nos casos estudados. Poderemos por exemplo determinar a variação de volume por que passa cada tecido durante o tratamento e consequentemente, determinar que fracções volumétricas apresentam os constituintes sólidos, agente osmótico e água residual no interior do tecido tratado.

Por outro lado, verificamos no caso da Glicerina com concentração de 50%, em que foram feitos 5 estudos independentes, a ocorrência de uma grande dispersão entre as evoluções temporais da transparência de cada estudo em particular relativamente à média calculada. Em comparação com os restantes agentes estudados, a dispersão é cerca de 5 a 6 vezes superior. Assim se tendo verificado, pretendemos posteriormente repetir os estudos feitos com Glicerina a 50%, de forma a verificarmos se esta dispersão elevada se mantém. Se assim for, teremos que investigar qual o motivo da sua ocorrência apenas para o caso deste agente nesta concentração em solução.

Seria interessante, por outro lado, realizar estudos semelhantes em tipos de tecido diferentes do músculo para observar se ocorrem comportamentos semelhantes ou não. Tais estudos iriam considerar alguns tipos de tecido animal numa mesma análise *in vitro*, mas também *in vivo* para observar eventuais diferenças entre a criação dos efeitos de transparência que possam surgir numa situação em que o tecido analisado se encontra num processo dinâmico com outros tecidos dentro do animal. Desta forma estaríamos a estudar uma situação mais real, que nos permitiria desenvolver aplicações clínicas reais onde a utilização de agentes osmóticos poderá trazer benefícios.

Pretendemos, finalmente aproximar-nos dessa situação vantajosa da aplicação dos efeitos de transparência em aplicações clínicas reais. Tal poderá ser feito com estudos experimentais em indivíduos voluntários, que necessitem de se submeter a intervenções clínicas de cirurgia e/ou fotodiagnóstico e fototerapia. Com o devido conhecimento e autorização dos pacientes, pretendemos em colaboração com o Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto desenvolver tais estudos. Nesses estudos, serão considerados vários tipos de informação para futuros

desenvolvimentos. Iremos fazer um registo pessoal do doente considerando o seu estado de saúde, indicando a patologia que apresenta e também o procedimento a que se submete e quais os efeitos resultantes dessa intervenção sem a aplicação de qualquer agente osmótico. Em face dos parâmetros observados e do tempo necessário à intervenção em cada caso, iremos atribuir um agente em particular e uma concentração específica para este tipo de aplicação. Numa futura situação clínica análoga o doente (mesmo doente ou outro) será submetido à intervenção, mas agora com a aplicação do referido agente. Por comparação entre os resultados obtidos nas duas situações experimentais, análise de benefícios para o procedimento clínico e efeitos secundários para o doente, iremos retirar conclusões acerca da aplicação do agente. Neste tipo de ensaios clínicos, pretendemos desenhar e desenvolver um aplicador/doseador de agente osmótico para aplicação em situações clínicas de ORL. Pretendemos no final desenvolver a tecnologia e a instrumentação, podendo posteriormente patentear os resultados da investigação. O desenho e projecto de tal instrumento necessitam de vários tipos de informação que esperamos recolher com os ensaios que pretendemos realizar.

**Referências**

## Referências

- [1] V. V. Tuchin. *Optical Clearing of Tissues and Blood*. Bellingham: SPIE Press, 2006.
- [2] R. Chang. *Química*, 5ª edição. McGraw-Hill Inc., 1994.
- [3] K. C. Jones and A. J. Gaudin. *Introdução à Biologia*, John Wiley and Sons Inc., Tradução para Português pela Fundação Calouste Gulbenkian, 1997.
- [4] C. F. Dunne-Daly. *Principles of radiotherapy and radiobiology*, *Seminars in Oncology Nursing* **15**(4):250-259, 1999.
- [5] T. Kanai, M. Endo, S. Minohara, N. Miyahara, H. Koyama-ito, H. Tomura, N. Matsufuji, Y. Futami, A. Fukumura, T. Hiraoka, Y. Furusawa, K. Ando, M. Suzuki, F. Soga, and K. Kawachi. *Biophysical characteristics of HIMAC clinical irradiation system for heavy-ion radiation therapy*, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **44**(1):201-210, 1999.
- [6] D. Jennings, A. Flint, B. C. H. Turton, and L. D. M. Nokes. *Outline of the application of radiation in medicine – Radiology, radiotherapy*. In *Introduction to medical electronics applications*. Edward Arnold – A division of Hodder Headline PLC, p. 45-74, 1995.
- [7] I. A. Cunningham and P. F. Judy. *Computed Tomography*. In *The Biomedical Engineering Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. J. D. Bronzino Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- [8] S. Conolly, A. Macovski, J. Pauly, J. Schenck, K. K. Kwong, D. A. Chesler, X. Hu, W. Chen, M. Patel and K. Ugurbil. *Magnetic Resonance Imaging*. In *The Biomedical Engineering Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. J. D. Bronzino Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

- [9] E. E. Konofagou. *Ultrasonic Imaging*. In *Biomedical Technology and devices Handbook*. J. Moore and G. Zouridakis Editors, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [10] R. E. Jr. Shroy, M. S. Van Lysel and M. J. Yaffe. *X-Ray*, In *The Biomedical Engineering Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. J. D. Bronzino Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- [11] T. D. Wang and G. Triadafilopoulos. *Endoscopy*. In *Biomedical Technology and devices Handbook*. J. Moore and G. Zouridakis Editors, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [12] A. J. McGoron, J. Franquiz. *Emission Imaging: SPECT and PET*. In *The Biomedical Engineering Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. J. D. Bronzino Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- [13] T. Vo-Dinh. *Biomedical Photonics: A Revolution at the Interface of Science and Technology*. In *The Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [14] V. V. Tuchin. *Historical Aspects and Overview*. In *Introduction to Optical Biomedical Diagnostics*. Editor V. V. Tuchin, Bellingham: SPIE Press, 2002.
- [15] R. K. Pandey. *Recent Advances in photodynamic therapy*, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines **4**: 368-373, 2000.
- [16] R. A. His, D. I. Rosenthal and E. Glatstein, *Photodynamic Therapy in the Treatment of Cancer – Current State of the Art*, Drugs **57**(5): 725-734, 1999.
- [17] V. S. Letokhov. *Laser Light in Biomedicine and the Life Sciences: From the Present to the Future*. In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.

- [18] A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzemberger and T. Lasser. *Optical Coherence Tomography – Principles and Applications*. Reports on Progress in Physics **66**: 239-303, IOP – Institute of Physics, 2003.
- [19] W. L. Wolf. *Glossary and Fundamental Constants*. In *Handbook of Optics Volume I: Fundamentals, Techniques and Design*. M. Bass, E. W. Van Stryland, D. R. Williams and W. L. Wolf Editors, McGraw Hill, 1995.
- [20] K. M. McNally-Heintzelman and A. J. Welsh. *Laser Tissue Welding*. In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [21] V. M. Weir and T. Y. Woo. *Photo – Assisted epilation: Review and personal observations*. Journal of Cutaneous Laser Therapy **1**: 135-143, 1999.
- [22] D. L. Floratos and J. J. M. C. H. de la Rosette. *Lasers in Urology*. British Journal of Urology International, **84**: 204 – 211, 1999.
- [23] J. J. Pandit, P. Chambers and S. O'Malley. *KTP laser-resistant properties of the reinforced laryngeal mask airway*. British Journal of Anaesthesia, **78**: 594-600, 1997.
- [24] E. Maguen, T. G. Chu, and D. Boyer. *Lasers in Ophthalmology*. In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [25] K. Suthamjariya and R. R. Anderson. *Lasers in Dermatology*. In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [26] L. Reinisch. *Lasers in Otolaryngology*, In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [27] M. Lebwohl and S. Ali. *Treatment of Psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy*. Journal of the American Academy of Dermatology **45**(4): 487-502, 2001.



- [28] M. Lebwohl and S. Ali. *Treatment of Psoriasis. Part 2. Systemic Therapies.* Journal of the American Academy of Dermatology **45**(5): 649-664, 2001.
- [29] M. Pais Clemente. *Lasers in Otorhinolaryngology.* In *BIOPTICS*, O. D. D. Soares and A. M. Scheggi Editors, SPIE Proceedings Vol. **1524**, 1992.
- [30] W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier. *Photodynamic Therapeutics: basic principles and clinical applications.* Drug Discovery Today, **4**(11): 507-517, 1999.
- [31] J. M. Schmitt. *Optical Coherence Tomography (OCT): A Review.* IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, **5**(4):1205-1215, 1999.
- [32] R. K. Wang, X. Xu, Y. He and J. B. Elder. *Investigation of Optical Clearing of Gastric Tissue Immersed with Hyperosmotic Agents.* IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, **9**(2): 234-242, 2003.
- [33] T. Vo-Dinh. *Basic Instrumentation in Photonics.* In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [34] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch. *A Review of the Optical Properties of Biological Tissues.* IEEE J. Quantum Electronics, **26**: 2166-2185, 1990.
- [35] V. V. Tuchin. *Light-Tissue Interactions.* In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [36] D. S. Goodman. *General Principles of Geometric Optics.* In *Handbook of Optics Volume I: Fundamentals, Techniques, and Design*. M. Bass, E. W. Van Stryland, D. R. Williams and W. L. Wolfe Editors, McGraw-Hill Inc., 1995.
- [37] A. J. Welsh and Craig Gardner. *Optical and Thermal Response of Tissue to Laser Radiation.* In *Lasers in Medicine*. R. W. Waynant Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2002.

- [38] S. A. Prahl. *Light Transport in Tissue*, PhD thesis. The University of Texas at Austin, 1988.
- [39] R. F. Reinoso, B. A. Telfer and M. Rowland. *Tissue Water Content in Rats Measured by Desiccation*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **38**: 87-92, 1997.
- [40] J. Mobley and T. Vo-Dinh. *Optical Properties of Tissue*. In *Biomedical Photonics Handbook*. T. Vo-Dinh Editor, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- [41] E. Hecht. *Optica*. Addison - Wesley Publishing Company, Tradução para Português pela Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.
- [42] S. Fantini, O. Schütz, J. Edler, S. Heywang-Köbrunner, L. Götz, M. A. Franceschini, H. Siebold. *Clinical Applications of Frequency-Domain Optical Mammography*. Proc. SPIE **3566**: 194-199, 1999.
- [43] R. Agah, A. H. Gandjbakhche, M. Motamedi, R. Nossal and R. F. Bonner. *Dynamics of Temperature Dependent Optical Properties of Tissue: Dependence on Thermal Induced Alteration*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, **43**(8): 839-846, 1996.
- [44] V. V. Tuchin. *Light scattering study of tissues*. Physics – Uspekhi, **40**(5) : 495-515, 1997.
- [45] V. V. Tuchin. *Optical Clearing of tissues and blood using the immersion method*. Journal of Physics D – Applied Physics, **38**: 2497-2518, 2005.
- [46] G. Vargas, K. F. Chan, S. L. Thomsen and A. J. Welch. *Use of Osmotically Active Agents to Alter Optical Properties of Tissue: Effects on the Detected Fluorescence Signal Measured through Skin*. Lasers in Surgery and Medicine, **29**: 213-220, 2001.

- [47] R. Cicchi and F. S. Pavone. *Contrast and Depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents*. Optics Express, **13**(7): 2337-2344, 2005.
- [48] I. V. Meglinski, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, D. Y. Churmakov and V. V. Tuchin. *The Enhancement of Confocal Images of Tissues at Bulk Optical Immersion*. Laser Physics, **13**(1): 65-69, 2003.
- [49] N. A. Lakodina, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Y. P. Sinichkin, V. V. Tuchin, X. Xu and R. Wang. *Immersion Optical Clearing of the Human Skin: in vivo Studies*, Conference Poster, CLEO 2002, 2002.
- [50] V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. H. Mavlutov and A. A. Mishin. *Light Propagation in Tissues with Controlled Optical Properties*. Journal of Biomedical Optics, **2**(4): 401-417, 1997.
- [51] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Y. P. Sinichkin, V. I. Kochubey, N. A. Lakodina and V. V. Tuchin. *Glucose and Mannitol Difusion in Human Dura Mater*. Biophysical Journal, **85**: 3310-3318, 2003.
- [52] *OOIBase Operating Software - Instruction Manual*, Version 1.52, Ocean Optics, Inc., 1999.
- [53] M. Kobayashi, T. Takatori, M. Nakajima, K. Saka, H. Iwase, M. Nagao, H. Nijima and Y. Matsuda. *Does de sequence of onset of rigor mortis depend on the proportion of muscle fibre types and on intra-muscular glycogen content?*. International Journal of Legal Medicine, **112**(3): 167-171, 1999.
- [54] L. Oliveira, A. Lage, M. Pais Clemente, V. V. Tuchin. *Concentration dependence of the optical clearing effect created in muscle immersed in glycerol and ethylene glycol*. SPIE Proceedings of Saratov Fall Meeting – 2006 (to be published), 2007.
- [55] M. R. Spiegel. *Probabilidade e Estatística*. McGraw-Hill, 1978.

- [56] J. Maroco. *Análise Estatística com utilização do SPSS*. Edições Sílabo, 2003.

**Anexos**

## **Anexo A**

### **Software OOIBase da Ocean Optics**

## Anexo A – Software OOIBase da Ocean Optics

A aplicação OOIBase da Ocean Optics permite configurar os vários parâmetros do Espectrofotómetro e comutar entre os diferentes modos de aquisição espectral. Neste anexo, vamos descrever quais as funcionalidades e opções deste software.

### A.1 Janela Principal

A janela principal deste software, onde são representados os espectros e existem os comandos e menus para actuação do utilizador apresenta o seguinte aspecto:

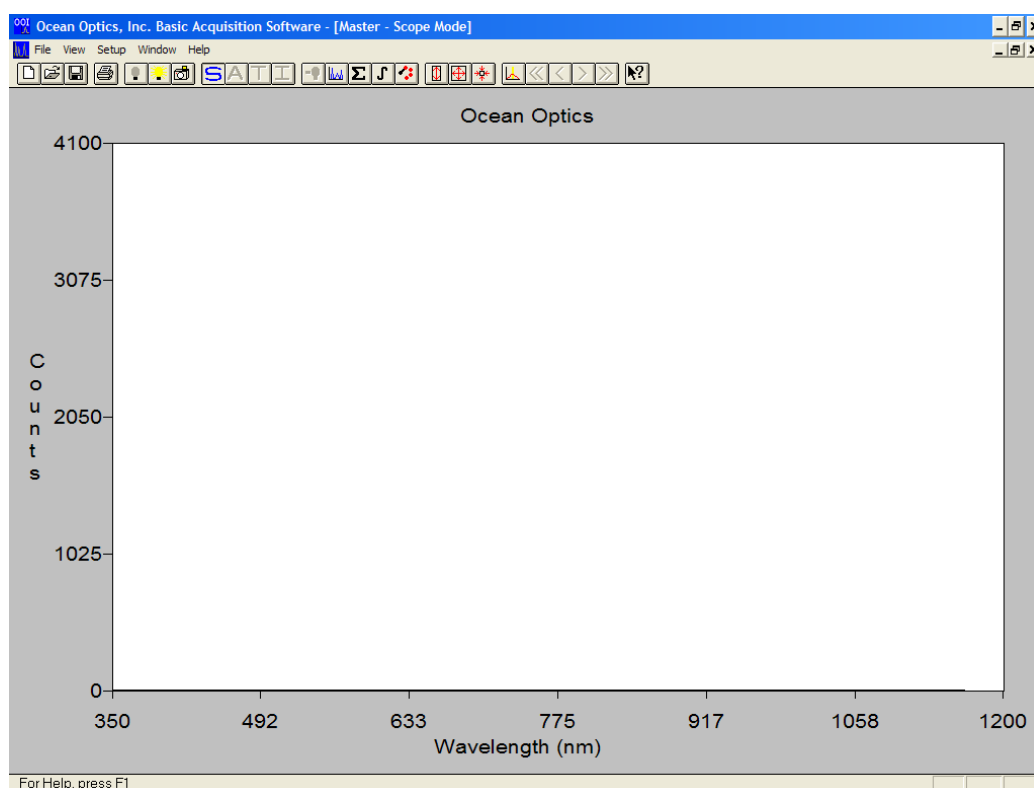


Figura A.1: Janela principal do software OOIBase da Ocean Optics

Nesta janela, podemos ver a parte central com fundo branco, onde o espectro é representado como o número de fótons (Counts) que chega ao espectrofotómetro em função do comprimento de onda (representado em nanómetros). Na parte superior da janela principal, existem diversas ferramentas para o utilizador. Nestas ferramentas encontram-se os diferentes menus e um conjunto de botões de acesso rápido que vamos descrever abaixo.

## A.2 Menus

Os menus disponíveis são 5: File, View, Setup, Window e Help. Vejamos as diferentes opções que cada um proporciona ao utilizador.

### A.2.1 Menu File

No menu File, o utilizador pode encontrar todas as opções necessárias para ler e guardar os espectros adquiridos pelo software.

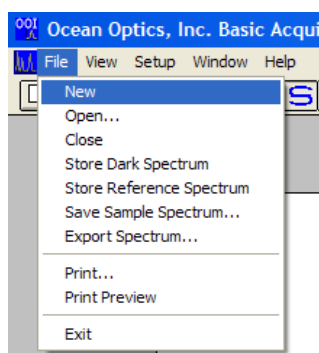


Figura A.2: Menu File

Neste menu encontramos as seguintes opções:

Tabela A.1: Opções do Menu File do software OOIBase da Ocean Optics

<b>New</b>	Cria uma nova janela de medição espectral.
<b>Open</b>	Abre ficheiros guardados em disco.
<b>Close</b>	Fecha a janela actual.
<b>Store Dark Spectrum</b>	Guarda o espectro de referência instrumental actual.
<b>Store Reference Spectrum</b>	Guarda o espectro de referência da fonte utilizada.
<b>Save sample Spectrum</b>	Guarda o espectro actual medido.
<b>Export Spectrum</b>	Permite guardar os espectros de referência, assim como o espectro medido a cada instante em formato ASCII.
<b>Print</b>	Imprime o espectro actual na impressora.
<b>Print Preview</b>	Visualização do espectro actual para impressão.
<b>Exit</b>	Sai deste software.



### A.2.2 Menu View

No menu View, temos outro conjunto de opções:

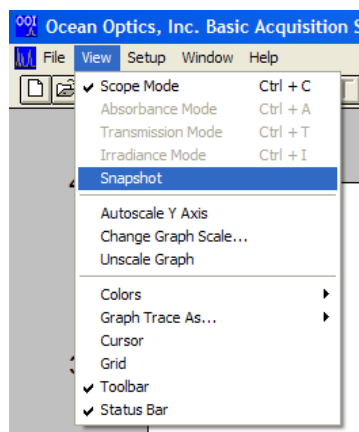


Figura A.3: Menu View

As opções deste menu são as seguintes:

Tabela A.2: Opções do Menu View do software OOIBase da Ocean Optics

<b>Scope Mode</b>	Activação do modo de operação Scope, para aquisição das referências espectrais a utilizar no estudo. Estas referências mantêm-se constantes durante o estudo. O sinal gráfico apresentado neste modo de operação é a tensão eléctrica que sai do conversor Analógico – Digital. Após aquisição das referências torna-se possível comutar para outros modos de operação.
<b>Absorbance Mode</b>	Modo de aquisição espectral de Absorção. O espectro apresentado neste modo representa a absorção do material em estudo em função do comprimento de onda. Este espectro é calculado internamente à custa da radiação que chega ao espectrofotómetro e dos espectros de referência anteriormente adquiridos <sup>(52)</sup> .
<b>Transmission Mode</b>	Semelhante ao anterior. O espectro apresentado neste modo representa a radiação óptica transmitida através da amostra em estudo em função do comprimento de onda. Este espectro é também calculado à custa da radiação medida e dos espectros de referência <sup>(52)</sup> .

<b>Irradiance Mode</b>	Este comando permite medir o espectro de emissão de uma fonte de radiação óptica. Assume-se que a fonte está referenciada a um corpo negro cuja temperatura de cor é conhecida e que é pedida ao utilizador na altura de medição. Pela temperatura de cor e dos espectros de referência medidos, o software calcula internamente o espectro de emissão da fonte a apresentar na janela principal <sup>(52)</sup> .
<b>Snapshot</b>	Este comando permite fixar no tempo o espectro apresentado na janela principal. Esta ferramenta permite identificar detalhes no espectro que possam variar muito rapidamente no tempo.
<b>Autoscale Y Axis</b>	Este comando permite alterar a escala Y do gráfico para que a área do espectro seleccionada se ajuste a toda a janela.
<b>Change Graph Scale</b>	Este comando abre uma nova janela que permite estabelecer os limites X e Y de visualização na janela principal para uma zona de interesse.
<b>Unscale Graph</b>	Este comando coloca a escala X e Y na janela principal para os seus valores pré-definidos pelo fabricante.
<b>Colors</b>	Este comando permite alterar as cores apresentadas na janela principal. Podem alterar-se as cores de fundo, do gráfico, do texto, do cursor e até da grelha, caso o utilizador assim o deseje.
<b>Graph Trace As</b>	Permite alternar a representação do espectro entre linhas ou pontos.
<b>Cursor</b>	Activa um cursor no gráfico actual, que pode ser deslocado com os botões de setas amarelas que se localizam na barra de ferramentas. Estes botões são activados com a colocação do cursor no gráfico.
<b>Grid</b>	Este comando activa uma grelha horizontal e vertical no gráfico.
<b>Toolbar</b>	Este comando activa ou desactiva a barra de ferramentas na parte superior da janela.
<b>Status Bar</b>	Este comando activa ou desactiva a barra de estado que se localiza abaixo da janela principal de representação gráfica e onde são apresentadas informações relativas à medição actual.

### A.2.3 Menu Setup

No menu Setup, temos outro conjunto de opções:

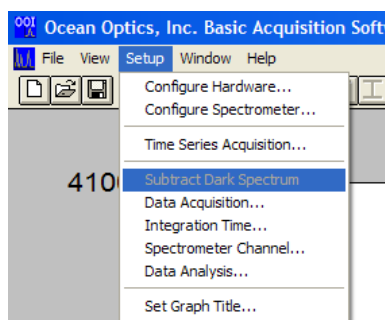


Figura A.4: Menu Setup

As opções deste menu são as seguintes:

Tabela A.3: Opções do Menu Setup do software OOIBase da Ocean Optics

<b>Configure Hardware</b>	Este comando abre uma nova janela onde podem ser introduzidos os parâmetros de configuração do espectrofotómetro que está ligado ao computador.
<b>Configure Spectrometer</b>	Permite a introdução de parâmetros relativos ao funcionamento do espectrofotómetro, como o número de canais que comporta ou os valores determinados na calibração em comprimento de onda.
<b>Time Series Acquisition</b>	Este comando permite alterar parâmetros relativos ao modo de aquisição. Valores como o número de varrimentos e o intervalo de tempo entre varrimentos são introduzidos aqui.
<b>Subtract Dark Spectrum</b>	Quando activado, este comando apresenta na janela principal um espectro que representa o espectro medido subtraído do espectro de ruído instrumental.
<b>Data Acquisition</b>	Permite modificar parâmetros relativos ao modo como se faz a aquisição de dados. Na nova janela que surge, podemos alterar o Trigger Mode, activar a subtracção do espectro de ruído aos espectros a medir também escolher o número de amostras espectrais a incluir no cálculo do espectro médio a representar.
<b>Integration Time</b>	Permite alterar o tempo de integração para a medição do espectro. Por defeito este valor é de 100 milissegundos.

<b>Spectrometer Channel</b>	Permite seleccionar qual o canal de funcionamento do espectrofotómetro em cada medição. Esta alteração apenas é aplicável em casos que existam vários canais.
<b>Data Analysis</b>	Permite alterar parâmetros do processamento e consequente representação dos espectros. Parâmetros como o número de medições para calcular a média, o número de pontos a considerar para suavizar o espectro e o método de suavização podem aqui ser modificados.
<b>Set Graph Title</b>	Permite atribuir um título ao gráfico apresentado na janela principal.

#### A.2.4 Menu Window

No menu Window, podemos controlar a forma de apresentação das janelas:

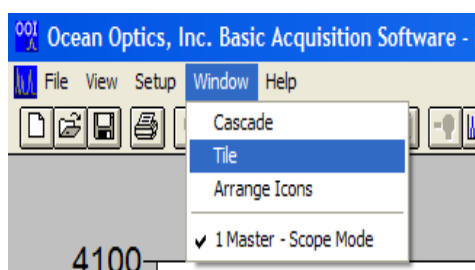


Figura A.5: Menu Window

As opções deste menu são as seguintes:

Tabela A.4: Opções do Menu Window do software OOIBase da Ocean Optics

<b>Cascade</b>	Permite uma apresentação em cascata de todas as janelas abertas no software.
<b>Tile</b>	Permite uma representação das janelas lado a lado e sem sobreposição – tal como tijolos encostados.
<b>Arrange Icons</b>	Este comando organiza a disposição de botões na parte superior da janela do software.
<b>Master – Scope Mode</b>	Estando seleccionado este comando, indica que se encontra activa a janela de modo Scope.

### A.2.5 Menu Help

Finalmente, no menu Help, podemos aceder ao documento de ajuda do software:



Figura A.6: Janela de ajuda do software OOIBase

Podemos também obter informação relativa aos detalhes do software, como o fabricante, a versão e o ano de edição:



Figura A.7: Janela de informação do software OOIBase

### A.3 Botões de acesso rápido

Na parte superior da janela do software, encontram-se também botões de acesso rápido a certas funcionalidades que o programa permite. Tais botões e respectivas funções encontram-se apresentados na figura seguinte:

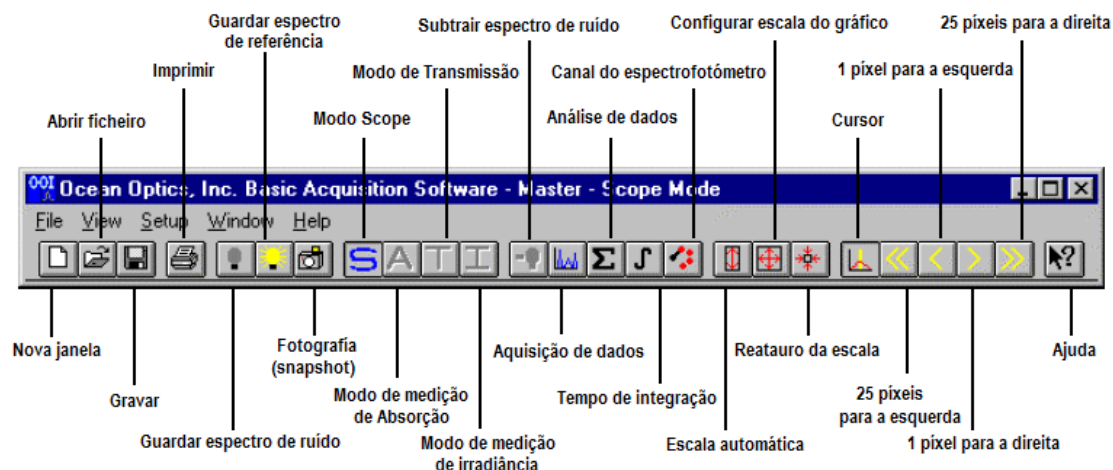


Figura A.8: Botões de acesso rápido do software OOIBase

Vamos utilizar este software para medir os espectros de transmissão dos tecidos ao longo do tempo durante o tratamento osmótico com os diferentes agentes que pretendemos estudar. A transmissão de radiação óptica medida através de um material é a percentagem de energia luminosa que atravessa o material relativamente à quantidade de energia luminosa que atravessa a mesma montagem experimental sem o material que se pretende estudar <sup>(52)</sup>. Esta quantidade de energia luminosa medida na montagem experimental sem o material é chamada de referência. A transmissão é representada matematicamente em percentagem relativamente a uma referência considerada padrão, como o ar ou o vácuo. O software OOIBase, calcula e apresenta automaticamente a curva espectral de transmitância quando se encontra nesse modo de aquisição. A equação que é utilizada para este cálculo interno do software é a seguinte <sup>(52)</sup>:

$$T_{\lambda}(\%) = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \times 100\% \quad \text{Equação A.1}$$

Considerando nesta equação  $S_{\lambda}$  a intensidade medida na amostra para cada comprimento de onda,  $D_{\lambda}$  a intensidade de ruído instrumental em cada comprimento de onda e  $R_{\lambda}$  a intensidade medida para o feixe de referência em cada comprimento de onda.

Para que seja possível realizar este tipo de medição, quando se inicia o software, este entra no modo Scope por defeito. De acordo com as recomendações do fabricante <sup>(52)</sup> devemos começar por fazer a aquisição do espectro de referência da fonte que atravessa a montagem experimental sem que a amostra esteja presente. Na zona de maior

intensidade do espectro, devemos conseguir um nível da ordem de 3500 contagens por segundo. Este nível de intensidade pode ser conseguido por ajuste da intensidade de emissão da fonte. Podemos ver na figura seguinte o espectro de referência registado nestas condições durante um estudo experimental.

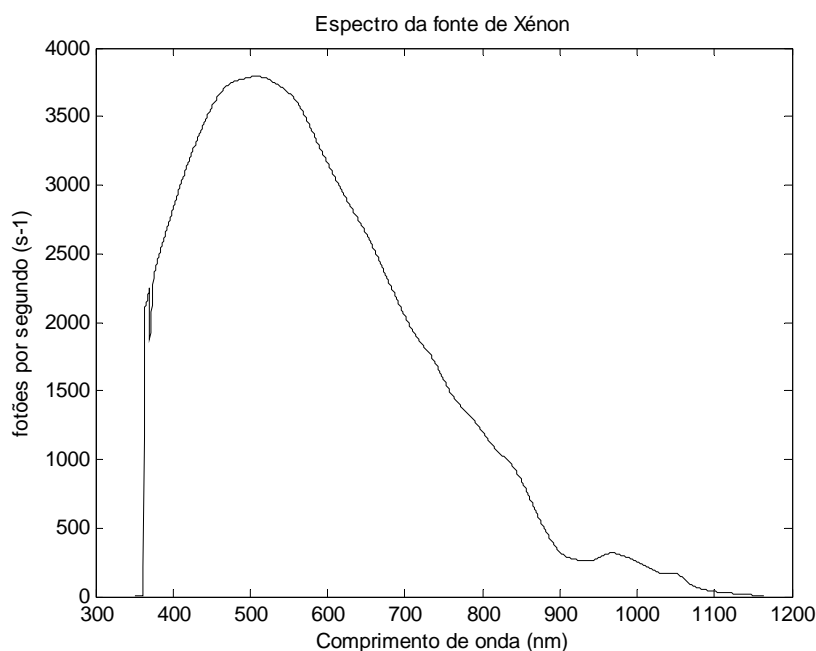


Figura A.9: Espectro da fonte de Xénon apresentado pelo software

O espectro de referência é registado se actuarmos sobre o botão “Guardar espectro de referência” da barra de ferramentas. Ainda no modo Scope é necessário registar o espectro de ruído instrumental que estará presente em cada medição que efectuemos. Assim, bloqueamos o caminho óptico entre a fonte e a entrada do espectrofotómetro e actuamos no botão “Guardar espectro de ruído” da barra de ferramentas<sup>(52)</sup>. Nesta altura estamos em condições para dar início às medições em transmissão, bastando para isso colocar as amostras a estudar no percurso óptico experimental da radiação óptica e alterar o modo de funcionamento para modo de Transmissão. Todo este processo constitui uma calibração dos níveis de intensidade do espectrofotómetro e do software, para que o conjunto possa produzir espectros fiáveis. Trata-se de um processo que é necessário realizar de cada vez que pretendemos realizar um estudo. Embora esta metodologia para aquisição das referências espectrais seja a recomendada pelo fabricante, iremos adquirir o espectro de referência de forma diferente para eliminar eventuais deficiências espectrais características da fonte<sup>(1, p:32)</sup>. Para a aquisição do espectro de referência da fonte, iremos injectar no cabo de fibra óptica do

espectrofotômetro a radiação óptica reflectida por uma superfície plana e suave que está recoberta por uma camada de Sulfato de Bário ( $\text{Ba}_2\text{SO}_4$ ). Este material constitui um branco de referência que reflecte todos os comprimentos de onda da radiação óptica de forma idêntica <sup>(1, p:32)</sup>. Controlamos a intensidade da fonte para atingir no espectrofotômetro um nível de cerca de 3500 fótons por segundo conforme recomendado pelo fabricante <sup>(52)</sup>.



## **Anexo B**

### **O Refractómetro de Abbe**

## Anexo B – O Refractómetro de Abbe

### B.1 O Refractómetro de Abbe

O Refractómetro de Abbe é um equipamento que permite medir o valor do índice de refração de amostras líquidas e sólidas. Este equipamento está disponível no mercado da instrumentação científica numa grande variedade de modelos e configurações. Este tipo de instrumento resultou da investigação realizada por Ernst Karl Abbe, um Físico Alemão que viveu entre 1840 e 1905. No ano de 1874 concluiu o seu primeiro refractómetro e publicou a descrição do instrumento e o método para a determinação do índice de refração de substâncias líquidas e sólidas ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)).

O índice de refração de qualquer substância transparente e isotrópica pode ser definido como o poder que o material possui para desviar da sua trajectória original um raio de radiação óptica incidente na superfície da substância segundo um ângulo oblíquo com a normal à interface. Esta descrição é representada matematicamente pela Lei de Snell – Descartes <sup>(41)</sup>:

$$\frac{\sin(i)}{\sin(r)} = \frac{n_r}{n_i} \quad \text{Equação B.1}$$

sendo **i** e **r** os ângulos de incidência e refração de um feixe que passa obliquamente do exterior para o interior do meio em estudo através da sua superfície (ver figura B.1). É habitual referir o ar como meio de referência na medição do índice de refração em vez do vácuo. O índice de refração do ar é usualmente representado por  $n_{ar}$  e o seu valor é um pouco superior à unidade <sup>(41)</sup>:

$$n_{ar} = 1,000293$$

A descrição gráfica da Lei de Snell – Descartes encontra-se representada na figura seguinte, onde são identificados os índices de refração do ar e da substância, assim como os ângulos de incidência e refração que o feixe de radiação óptica faz com a normal à superfície de separação entre os dois meios <sup>(41)</sup>:

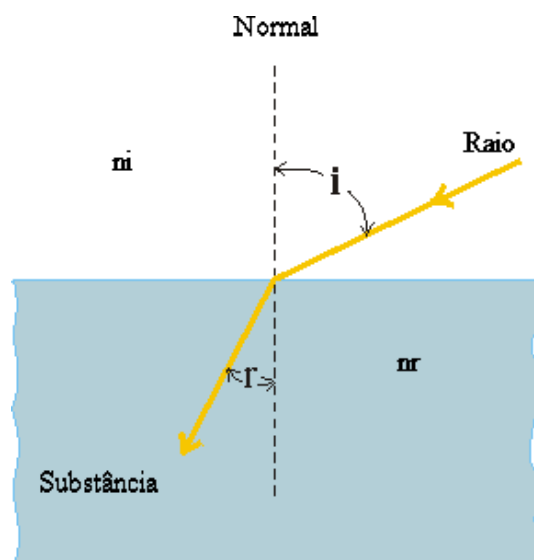


Figura B.1: Desvio de um feixe de radiação óptica na superfície entre o ar e um meio

De forma mais exacta, o Índice de Refracção é uma propriedade característica de cada material definida da seguinte forma:

“A radiação óptica viaja com velocidades diferentes em meios de propagação diferentes. Quanto mais denso for o meio de propagação da radiação óptica, mais reduzida será a velocidade de propagação da radiação óptica nesse meio. Quando a radiação óptica passa de um meio para outro segundo qualquer ângulo diferente de 90°, não altera apenas a sua velocidade, altera também a sua direcção de propagação na interface entre os dois meios.” ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com))

O índice de refração (representado pela letra  $n$ ) de um meio é definido como a razão entre a velocidade da radiação óptica no vácuo e a velocidade da radiação óptica no meio em causa.

A origem microscópica do índice e refração tem a ver com a constituição do material. A relação matemática entre este parâmetro e certas características microscópicas como a permissividade eléctrica ou a permeabilidade magnética encontra-se na equação seguinte ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)):

$$n = \frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}} \quad \text{Equação B.2}$$

em que  $\epsilon$  é a permissividade eléctrica do material,  $\mu$  a sua permeabilidade magnética,  $\epsilon_0$  é a permissividade eléctrica do vácuo,  $\mu_0$  a permeabilidade magnética do vácuo,  $c$  a

velocidade de propagação da radiação óptica no vácuo e  $v$  a velocidade de propagação no material.

Para que seja possível realizar medições deste parâmetro com um refractómetro de Abbe, é necessário considerar um caso limite da Lei de Snell – Descartes. Trata-se da reflexão interna total dos raios luminosos que incidam na superfície que limita o meio a ângulos superiores ao ângulo crítico do material ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)). A figura seguinte mostra alguns raios que divergem de uma fonte pontual dentro de um meio com índice de refração  $n_i$  e que atingem a interface com um outro meio de índice de refração  $n_r$ , em que  $n_i > n_r$ .

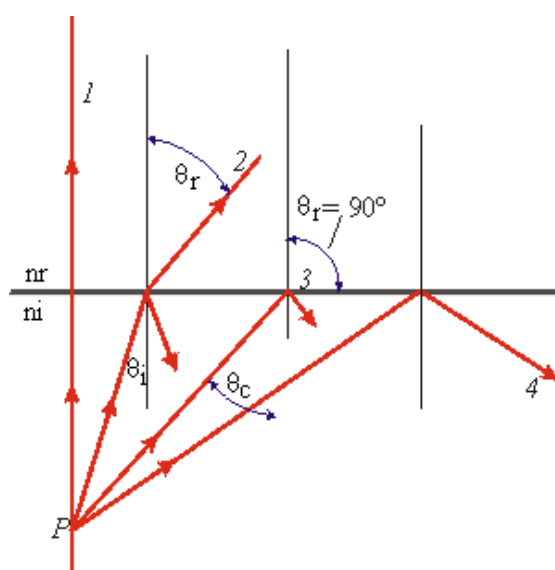


Figura B.2: Ângulo Crítico e reflexão interna total

Pela Lei de Snell – Descartes, verificamos que:

$$\sin(\theta_r) = \frac{n_i}{n_r} * \sin(\theta_i) \quad \text{Equação B.3}$$

Uma vez que  $n_i / n_r$  é superior à unidade, e como  $\sin(\theta_r)$  é sempre maior do que  $\sin(\theta_i)$ , então  $\sin(\theta_r)$  atinge a unidade quando  $\theta_r = 90^\circ$ . Isto verifica-se para um ângulo de incidência na superfície inferior a  $90^\circ$ . Este caso é ilustrado pelo raio 3 da figura anterior, que sai do ponto de interacção com a superfície mesmo sobre a linha da superfície, apresentando um ângulo de refração igual a  $90^\circ$ . O ângulo de incidência na superfície, para o qual se verifica uma refração a  $90^\circ$  com a normal à superfície é o chamado ângulo crítico do material e é costume designá-lo por  $\theta_c$ . Se o ângulo de incidência na superfície for superior ao ângulo crítico, então o valor de  $\sin(\theta_r)$  é superior

à unidade se for calculado pela Lei de Snell – Descartes ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)). Como sabemos pela trigonometria, o valor máximo do seno de um ângulo não pode ultrapassar a unidade. Assim podemos concluir que, para ângulos de incidência na superfície superiores ao ângulo crítico, o raio luminoso não passa além da superfície de interface entre os dois meios. Em alternativa ele é totalmente reflectido nessa interface. A reflexão interna total da radiação óptica pode ocorrer apenas quando os raios de radiação óptica são incidentes na superfície de interface com um meio cujo índice de refração é inferior do seu correspondente para o meio em que viaja a radiação óptica ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)).

Apenas com a aplicação deste princípio da reflexão interna total é possível medir o índice de refração num refractómetro de Abbe conforme veremos.

## B.2 Descrição dos componentes do refractómetro

O refractómetro de Abbe é um instrumento com vários componentes. Vamos descrever cada um e sua função para o processo de medição do índice de refração. Como orientação nesta descrição, vamos socorrer-nos da figura seguinte ([www.refractometer.com.cn](http://www.refractometer.com.cn)):

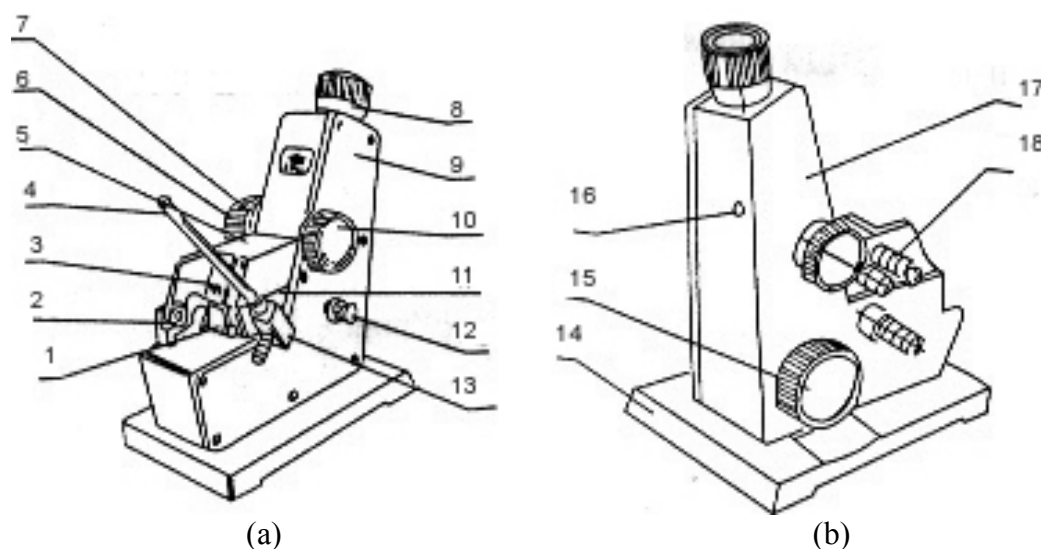


Figura B.3: Componentes do refractómetro de Abbe: (a) vista frontal; (b) vista traseira

Pela figura anterior temos os seguintes componentes:

Tabela B.1: Componentes típicos de um refractómetro de Abbe (Ver figura B.3)

1. Espelho reflector	10. Botão de fixação dos dois prismas em posição de medição
2. Axilas	11. Suporte do prisma de refração
3. Protecção da zona de medição	12. Condensador para iluminação do círculo com graduação
4. Termómetro	13. Ligação para Termómetro
5. Suporte do prisma de iluminação	14. Base de suporte
6. Botão para ajuste de dispersão	15. Botão de ajuste do retículo com a interface claro/escuro
7. Botão com escala para medição da dispersão	16. Parafuso de calibração
8. Ocular	17. Caixa de protecção do refractómetro
9. Placas de protecção	18. Conector do termóstato

### B.3 Princípio de funcionamento

Na sua generalidade, os refractómetros de Abbe determinam o índice de refração do material em estudo pela medição do ângulo crítico da refração. A radiação óptica proveniente de uma fonte luminosa (ver figura seguinte) é direccionada contra a interface entre um prisma e a amostra que pretendemos estudar ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)). Os raios luminosos chegam a esta interface com diferentes ângulos de incidência (visto que a fonte é virtualmente pontual e apresenta divergência). Os raios reflectidos formam uma imagem (ABC), em que C é a linha de projecção dos raios que incidiram na interface com o ângulo de incidência igual ao ângulo crítico. Os raios projectados na zona A foram totalmente reflectidos na interface e os raios projectados na zona B foram parcialmente refractados para o interior da amostra em estudo e absorvidos. Desta forma, no plano de formação da imagem, obtemos uma projecção de uma zona clara (A) e uma zona escura (B). A posição da linha que separa as zonas clara e escura (C) refere-se ao valor do ângulo crítico e consequentemente (pela lei de Snell - Descartes) ao valor do índice de refração da amostra em estudo ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)).

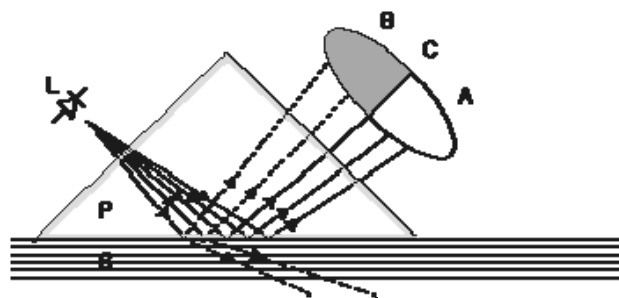


Figura B.4: Princípio de funcionamento do refractômetro de Abbe

O índice de refração aumenta normalmente com concentrações crescentes do material. Desta descrição concluímos que a imagem óptica projectada altera-se para diferentes concentrações do material em estudo, conforme está representado na figura seguinte. A posição da linha divisória entre as zonas clara e escura (linha C) pode deslocar-se para cada uma das zonas conforme varia o ângulo crítico em função do índice de refração da amostra ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)).

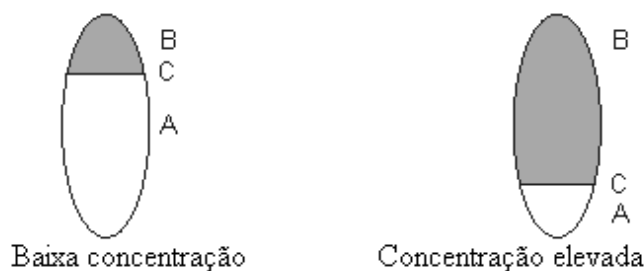


Figura B.5: Imagens projectadas de acordo com a concentração da amostra

Num refractômetro de Abbe, esta imagem projectada dos raios pode ser vista se observarmos pela ocular. Na parte lateral do refractômetro encontra-se um botão que permite ajustar na imagem projectada a linha limítrofe entre as zonas claro/escuro com um retículo para obter o valor correcto do índice de refração da amostra em estudo ([www.chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/](http://www.chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/)).

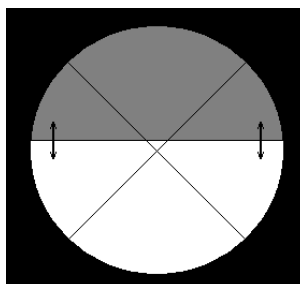


Figura B.6: Alinhamento do retículo com linha separadora das zonas claro/escuro

Para além desta imagem, podemos também observar através da ocular uma escala métrica que identifica o valor medido para o índice de refração da amostra em estudo ([www.chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/](http://www.chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/)).

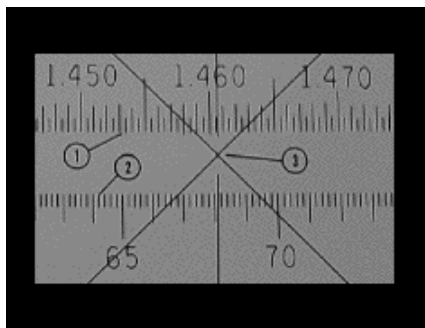


Figura B.7: Escala com valores de índice de refração para leitura

Ao rodar o botão de alinhamento do retículo com a linha divisória entre as zonas clara e escura da imagem projectada, a escala representada na figura anterior desloca-se também para fornecer o valor de índice de refração correspondente ao alinhamento e por conseguinte à amostra em estudo ([www.refractometer.com.cn](http://www.refractometer.com.cn)).

Assim, quando procedemos com uma medição referente a uma amostra colocada na zona de estudo, necessitamos apenas de rodar o botão lateral até conseguirmos alinhar o retículo com a linha de projecção dos raios correspondentes a ângulos críticos de incidência. Uma vez conseguido tal alinhamento, observamos o valor representado na escala graduada, que corresponde ao índice de refração da amostra em estudo ([www.refractometer.com.cn](http://www.refractometer.com.cn)).

#### B.4 Factores que influenciam a medição

Geralmente, o valor do índice de refração de qualquer substância diminui com o aumento da temperatura e também com o aumento do comprimento de onda da radiação óptica utilizada na iluminação da amostra durante o processo de medição. Desta forma, torna-se necessário adoptar uma referência de temperatura e de comprimento de onda da radiação óptica utilizada em todas as medições a realizar. Cada medição será então ajustada e referenciada aos valores seleccionados para a temperatura e comprimento de onda utilizados. O comprimento de onda da radiação óptica de iluminação, deve em particular ser bem definido, devido à grande variação dos valores medidos com este parâmetro. Cada fabricante utiliza um comprimento de onda pré-definido. Como exemplo, uma fonte monocromática com comprimento de onda no vermelho ( $\lambda=660$



nm) é utilizada nos refractómetros fabricados pela empresa K-Patents ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)).

Considerando as variações do índice de refacção com a temperatura, é importante tomar certas precauções para controlar e fixar esta variável. A determinação de um coeficiente médio de temperatura permite estimar os valores de índice de refacção de certas amostras em relação a outras consideradas como referencia. Para estudos que requeiram maior precisão, tal coeficiente deve ser determinado a partir de várias medições experimentais. A dependência do índice de refacção com a temperatura é aproximadamente linear numa gama limitada de temperaturas. A maioria dos refractómetros actuais contém um termómetro que mede a temperatura num ponto junto ao prisma. Em alguns casos, o refractómetro contém um microprocessador que efectua uma compensação de temperatura se tal for necessário. Para casos mais críticos, a compensação poderá ser não linear ([www.kpatents.com](http://www.kpatents.com)).

## **B.5 Instruções de utilização**

Os refractómetros são adquiridos com um manual de instruções, onde todas as características do equipamento e instruções de manuseamento são apresentadas. Alguns fabricantes disponibilizam tais manuais nas suas páginas na Internet, para um fácil acesso por parte dos utilizadores. Neste manual existem pontos importantes a ter em conta no manuseamento do refractómetro para avaliar o índice de refacção de substâncias.

### **B.5.1 Características técnicas**

O primeiro aspecto a ter em conta na leitura do manual de instruções é verificar quais as características do equipamento. Nesta secção do manual, podemos verificar a gama de valores que o equipamento permite medir, a sua precisão, as gamas de temperatura e comprimentos de onda a utilizar nas medições ([www.refractometer.com.cn/](http://www.refractometer.com.cn/)).

Assim como características de um refractómetro podemos verificar num manual de utilização os seguintes dados:

Tabela B.2: Características típicas de um refractómetro de Abbe

Gama de medição do índice de refração:	1.300 ~ 1.700
Precisão de medição do índice de refração:	0.0002
Gama de temperaturas de medição:	0°C ~ 37°C
Peso:	3 kg

### B.5.2 Calibração

Antes de ser realizada qualquer medição em amostras, é necessário verificar o bom estado de funcionamento do refractómetro. Assim é aconselhável verificar o valor do índice de refração de uma amostra padrão. A amostra padrão (fornecida com o refractómetro) que pode ser sólida ou líquida, conforme o tipo de medição que pretendemos realizar, é colocada sobre o prisma do refractómetro (ou entre dois prismas em alguns refractómetros). A zona de medição é fechada para que não seja injectada radiação óptica ambiente. Olhando pela ocular verificamos se a linha de separação entre zonas clara e escura da imagem projectada (ver figura B6) se encontra alinhada com o retículo. Se tal não acontecer, devemos ajustar o botão de ajuste do retículo (5 na figura B3), para alinhar a linha com o retículo. Uma vez alinhado o retículo com a linha limítrofe das zonas clara/escuro, podemos ler o valor que surge na escala de índices de refração. Se este valor não corresponder ao valor tabelado para a amostra padrão a ser ensaiada, podemos ajustar o valor da escala pelo parafuso de calibração do espectrofotómetro (16 na figura B3).

Entre medições do refractómetro e também após a sua calibração, é necessário limpar a superfície do prisma, onde as amostras são colocadas para realizar as leituras. Tal limpeza é necessária para retirar eventuais gorduras que possam acumular-se nesta zona de suporte das amostras. Proceder-se com a limpeza, regando a superfície do prisma com álcool o mais puro possível (90%), ou com uma mistura de iguais proporções de álcool e éter ([www.refractometer.com.cn/](http://www.refractometer.com.cn/)).

### B.5.3 Medições em líquidos

Para medir o índice de refração de amostras líquidas devemos colocar a amostra sobre a superfície do prisma de iluminação com algum cuidado para que seja distribuída

uniformemente sobre a superfície. Depois de colocada a amostra devemos fechar a zona de sensorização com a cobertura superior (ou segundo prisma) e bloquear com o botão de fixação (10 na figura B3). Considerando-se que o líquido a estudar é homogéneo, se encontra uniformemente distribuído em todo o campo de visão do refractómetro e não apresenta bolhas de ar, começamos por fechar a zona de medição, colocando por cima da amostra o segundo prisma ou espelho reflector (conforme o caso do refractómetro em causa). Bloqueamos a montagem experimental com o botão de fixação (10 na figura B3). Podemos então olhar pela ocular para verificar o alinhamento da linha de separação das zonas claro/escuro com o retículo. Deve rodar-se a ocular para visualização focada da linha de separação entre as zonas claro/escuro na imagem projectada. De seguida, iremos rodar o botão da escala (15 na figura B3) para alinhar a linha de separação das zonas claro/escuro com o centro do retículo. Uma vez conseguido este alinhamento, podemos efectuar a leitura do valor do índice de refacção da amostra na escala vista pela ocular ([www.refractometer.com.cn/](http://www.refractometer.com.cn/)).

#### **B.5.4 Medições em sólidos**

Para se realizarem medições do índice de refacção em amostras sólidas transparentes, devemos proceder de acordo com os passos descritos anteriormente, tomando algumas precauções em relação ao objecto a estudar. Este deve apresentar uma superfície plana e suave para se ajustar perfeitamente à superfície do prisma do refractómetro. Garantindo que tanto o objecto como a superfície do prisma se encontram limpos, colocamos o objecto na superfície do prisma e fechando a zona experimental iniciamos o processo de medição ([www.refractometer.com.cn/](http://www.refractometer.com.cn/)).

## **Anexo C**

### **Programas utilizados no processamento espectral**

## **Anexo C – Programas utilizados no processamento espectral**

### **C.1 Programa para representação da evolução temporal da transmitância para os tecidos estudados em tratamento com soluções em diferentes concentrações de Glicerina e Etileno Glicol**

Os Programas apresentados abaixo foram desenvolvidos e executados em ambiente MATLAB<sup>TM</sup>. Em cada estudo espectral óptico em transmissão em que se utilizaram soluções de Glicerina e Etileno Glicol com diferentes concentrações para tratar os tecidos biológicos, utilizou-se um programa como o que se encontra apresentado abaixo para processar os espectros e representar os gráficos na forma escolhida.

Este programa tipo, lê os espectros do estudo considerado e começa por fazer uma representação dos espectros medidos nos 15 minutos de tratamento com pontos de medição a cada minuto. Desta forma, é possível visualizar a forma espectral da transmissão medida numa banda de comprimentos de onda extensa. Posteriormente cria matrizes com os valores de cada espectro medido no tempo correspondentes a 10 comprimentos de onda uniformemente distribuídos na banda de aquisição para representação da evolução individual da transmitância nesses valores. Os comprimentos de onda escolhidos para esta e outras representações são 390 nm, 420 nm, 455 nm, 490 nm, 510 nm, 532 nm, 575 nm, 615 nm, 700 nm e 800 nm. A representação das curvas temporais de variação da transmitância para estes comprimentos de onda é feita com pontos de medição a cada minuto nos 15 minutos de tratamento. O mesmo procedimento é adoptado de seguida para representar a evolução individual por comprimento de onda nos primeiros 110 segundos de medição com pontos a cada 5 segundos. Finalmente é construída uma matriz 3-D para representação da evolução temporal dos espectros de transmitância nos primeiros 110 segundos de tratamento. Estas duas ultimas representações servem para identificar as oscilações iniciais por que passa a transmitância espectral devido aos processos de desidratação e de adaptação de índices de refacção no interior dos tecidos.

Consoante o estudo considerado, pode ser feita ou não a representação dos espectros medidos a cada minuto de tratamento num mesmo gráfico. Para os casos em que essa representação é confusa de interpretar, não será considerada para este trabalho. Por outro lado, o tempo de medição dos espectros depende do agente aplicado. Assim, as

representações que consideramos para um período de 15 minutos poderão variar para outros casos.

```

1 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2 %
3 % Programa de representação de espectros de Transmissão medidos %
4 % em músculo da parede abdominal do rato com tratamento osmótico %
5 % por imersão em Glicerina 75% %
6 % %
7 % glycerol.m %
8 % %
9 % autor: Luís Oliveira %
10 % %
11 % Programa desenvolvido no âmbito da Tese de Dissertação %
12 % do MEB - Mestrado em Engenharia Biomédica FEUP %
13 % %
14 % Orientador: Professor Doutor Armando Lage %
15 % Co-Orientador: Professor Doutor M. Pais Clemente %
16 % Consultor: Professor Doutor Valery V. Tuchin %
17 % %
18 % © 2006 %
19 % %
20 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
21
22 clear all
23 clc
24
25 % Leitura dos espectros medidos de
26 A0=dlmread('A0.tra','\t',3,0); A1=dlmread('A1.tra','\t',3,0);
27 A2=dlmread('A2.tra','\t',3,0); A3=dlmread('A3.tra','\t',3,0);
28 A4=dlmread('A4.tra','\t',3,0); A5=dlmread('A5.tra','\t',3,0);
29 A6=dlmread('A6.tra','\t',3,0); A7=dlmread('A7.tra','\t',3,0);
30 A8=dlmread('A8.tra','\t',3,0); A9=dlmread('A9.tra','\t',3,0);
31 A10=dlmread('A10.tra','\t',3,0); A11=dlmread('A11.tra','\t',3,0);
32 A12=dlmread('A12.tra','\t',3,0); A13=dlmread('A13.tra','\t',3,0);
33 A14=dlmread('A14.tra','\t',3,0); A15=dlmread('A15.tra','\t',3,0);
34 A16=dlmread('A16.tra','\t',3,0); A17=dlmread('A17.tra','\t',3,0);
35 A18=dlmread('A18.tra','\t',3,0); A19=dlmread('A19.tra','\t',3,0);
36 A20=dlmread('A20.tra','\t',3,0); A21=dlmread('A21.tra','\t',3,0);
37 A22=dlmread('A22.tra','\t',3,0); A23=dlmread('A23.tra','\t',3,0);
38 A24=dlmread('A24.tra','\t',3,0); A25=dlmread('A25.tra','\t',3,0);
39 A26=dlmread('A26.tra','\t',3,0); A27=dlmread('A27.tra','\t',3,0);
40 A28=dlmread('A28.tra','\t',3,0); A29=dlmread('A29.tra','\t',3,0);
41 A30=dlmread('A30.tra','\t',3,0); A31=dlmread('A31.tra','\t',3,0);
42 A32=dlmread('A32.tra','\t',3,0); A33=dlmread('A33.tra','\t',3,0);
43 A34=dlmread('A34.tra','\t',3,0); A35=dlmread('A35.tra','\t',3,0);
44 A36=dlmread('A36.tra','\t',3,0); A37=dlmread('A37.tra','\t',3,0);
45 A38=dlmread('A38.tra','\t',3,0); A39=dlmread('A39.tra','\t',3,0);
46 A40=dlmread('A40.tra','\t',3,0); A41=dlmread('A41.tra','\t',3,0);
47 A42=dlmread('A42.tra','\t',3,0); A43=dlmread('A43.tra','\t',3,0);
48 A44=dlmread('A44.tra','\t',3,0); A45=dlmread('A45.tra','\t',3,0);
49 A46=dlmread('A46.tra','\t',3,0); A47=dlmread('A47.tra','\t',3,0);
50 A48=dlmread('A48.tra','\t',3,0); A49=dlmread('A49.tra','\t',3,0);
51 A50=dlmread('A50.tra','\t',3,0); A51=dlmread('A51.tra','\t',3,0);
52 A52=dlmread('A52.tra','\t',3,0); A53=dlmread('A53.tra','\t',3,0);
53 A54=dlmread('A54.tra','\t',3,0); A55=dlmread('A55.tra','\t',3,0);
54 A56=dlmread('A56.tra','\t',3,0); A57=dlmread('A57.tra','\t',3,0);
55 A58=dlmread('A58.tra','\t',3,0); A59=dlmread('A59.tra','\t',3,0);
56 A60=dlmread('A60.tra','\t',3,0); A61=dlmread('A61.tra','\t',3,0);

```

```

57 A62=dlmread( 'A62.tra','\t',3,0); A63=dlmread('A63.tra','\t',3,0);
58 A64=dlmread( 'A64.tra','\t',3,0); A65=dlmread('A65.tra','\t',3,0);
59 A66=dlmread( 'A66.tra','\t',3,0); A67=dlmread('A67.tra','\t',3,0);
60 A68=dlmread( 'A68.tra','\t',3,0); A69=dlmread('A69.tra','\t',3,0);
61 A70=dlmread( 'A70.tra','\t',3,0);
62
63 %% Separação de espectros nos dois eixos
64 A0_x=A0(:,1); A0_y=A0(:,2); A1_x=A1(:,1); A1_y=A1(:,2);
65 A2_x=A2(:,1); A2_y=A2(:,2); A3_x=A3(:,1); A3_y=A3(:,2);
66 A4_x=A4(:,1); A4_y=A4(:,2); A5_x=A5(:,1); A5_y=A5(:,2);
67 A6_x=A6(:,1); A6_y=A6(:,2); A7_x=A7(:,1); A7_y=A7(:,2);
68 A8_x=A8(:,1); A8_y=A8(:,2); A9_x=A9(:,1); A9_y=A9(:,2);
69 A10_x=A10(:,1); A10_y=A10(:,2); A11_x=A11(:,1); A11_y=A11(:,2);
70 A12_x=A12(:,1); A12_y=A12(:,2); A13_x=A13(:,1); A13_y=A13(:,2);
71 A14_x=A14(:,1); A14_y=A14(:,2); A15_x=A15(:,1); A15_y=A15(:,2);
72 A16_x=A16(:,1); A16_y=A16(:,2); A17_x=A17(:,1); A17_y=A17(:,2);
73 A18_x=A18(:,1); A18_y=A18(:,2); A19_x=A19(:,1); A19_y=A19(:,2);
74 A20_x=A20(:,1); A20_y=A20(:,2); A21_x=A21(:,1); A21_y=A21(:,2);
75 A22_x=A22(:,1); A22_y=A22(:,2); A23_x=A23(:,1); A23_y=A23(:,2);
76 A24_x=A24(:,1); A24_y=A24(:,2); A25_x=A25(:,1); A25_y=A25(:,2);
77 A26_x=A26(:,1); A26_y=A26(:,2); A27_x=A27(:,1); A27_y=A27(:,2);
78 A28_x=A28(:,1); A28_y=A28(:,2); A29_x=A29(:,1); A29_y=A29(:,2);
79 A30_x=A30(:,1); A30_y=A30(:,2); A31_x=A31(:,1); A31_y=A31(:,2);
80 A32_x=A32(:,1); A32_y=A32(:,2); A33_x=A33(:,1); A33_y=A33(:,2);
81 A34_x=A34(:,1); A34_y=A34(:,2); A35_x=A35(:,1); A35_y=A35(:,2);
82 A36_x=A36(:,1); A36_y=A36(:,2); A37_x=A37(:,1); A37_y=A37(:,2);
83 A38_x=A38(:,1); A38_y=A38(:,2); A39_x=A39(:,1); A39_y=A39(:,2);
84 A40_x=A40(:,1); A40_y=A40(:,2); A41_x=A41(:,1); A41_y=A41(:,2);
85 A42_x=A42(:,1); A42_y=A42(:,2); A43_x=A43(:,1); A43_y=A43(:,2);
86 A44_x=A44(:,1); A44_y=A44(:,2); A45_x=A45(:,1); A45_y=A45(:,2);
87 A46_x=A46(:,1); A46_y=A46(:,2); A47_x=A47(:,1); A47_y=A47(:,2);
88 A48_x=A48(:,1); A48_y=A48(:,2); A49_x=A49(:,1); A49_y=A49(:,2);
89 A50_x=A50(:,1); A50_y=A50(:,2); A51_x=A51(:,1); A51_y=A51(:,2);
90 A52_x=A52(:,1); A52_y=A52(:,2); A53_x=A53(:,1); A53_y=A53(:,2);
91 A54_x=A54(:,1); A54_y=A54(:,2); A55_x=A55(:,1); A55_y=A55(:,2);
92 A56_x=A56(:,1); A56_y=A56(:,2); A57_x=A57(:,1); A57_y=A57(:,2);
93 A58_x=A58(:,1); A58_y=A58(:,2); A59_x=A59(:,1); A59_y=A59(:,2);
94 A60_x=A60(:,1); A60_y=A60(:,2); A61_x=A61(:,1); A61_y=A61(:,2);
95 A62_x=A62(:,1); A62_y=A62(:,2); A63_x=A63(:,1); A63_y=A63(:,2);
96 A64_x=A64(:,1); A64_y=A64(:,2); A65_x=A65(:,1); A65_y=A65(:,2);
97 A66_x=A66(:,1); A66_y=A66(:,2); A67_x=A67(:,1); A67_y=A67(:,2);
98 A68_x=A68(:,1); A68_y=A68(:,2); A69_x=A69(:,1); A69_y=A69(:,2);
99 A70_x=A70(:,1); A70_y=A70(:,2);
100
101 % Representação dos espectros de transmitância do tecido para
102 % avaliação temporal do efeito de transparência criado pela
103 % Glicerina a 75% (escala longa de tempo - 1 em 1 minuto)
104 % Figura 1
105 figure
106 plot(A0_x,A0_y,A12_x,A12_y,A30_x,A30_y,A42_x,A42_y,A54_x,A54_y, A
      A58_x,A58_y,A62_x,A62_y, A66_x,A66_y,A70_x,A70_y);
107 axis([370 800 7 20]);
108 xlabel('Comprimento de Onda (nm)');
109 ylabel('Transmitância (%)');
110 title('Evolução da transmitância espectral do musculo imerso em
      Glicerina 75%');
111 legend('Tecido Natural', '1 minuto após imersão', '3 minutos',
      '5 minutos', '7 minutos', '9 minutos', '11 minutos',
      '13 minutos', '15 minutos');
112
113 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de

```

```

114 % onda em todos os espectros em larga escala
115 lamb1_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
116 lamb1_y=[A0_y(82,1),A12_y(82,1),A24_y(82,1),A30_y(82,1), ↵
            A36_y(82,1),A42_y(82,1),A48_y(82,1),A54_y(82,1), ↵
            A56_y(82,1),A58_y(82,1),A60_y(82,1),A70_y(82,1)];
117 lamb2_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
118 lamb2_y=[A0_y(144,1),A12_y(144,1),A24_y(144,1),A30_y(144,1), ↵
            A36_y(144,1),A42_y(144,1),A48_y(144,1),A54_y(144,1), ↵
            A56_y(144,1),A58_y(144,1),A60_y(144,1),A70_y(144,1)];
119 lamb3_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
120 lamb3_y=[A0_y(216,1),A12_y(216,1),A24_y(216,1),A30_y(216,1), ↵
            A36_y(216,1),A42_y(216,1),A48_y(216,1),A54_y(216,1), ↵
            A56_y(216,1),A58_y(216,1),A60_y(216,1),A70_y(216,1)];
121 lamb4_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
122 lamb4_y=[A0_y(290,1),A12_y(290,1),A24_y(290,1),A30_y(290,1), ↵
            A36_y(290,1),A42_y(290,1),A48_y(290,1),A54_y(290,1), ↵
            A56_y(290,1),A58_y(290,1),A60_y(290,1),A70_y(290,1)];
123 lamb5_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
124 lamb5_y=[A0_y(332,1),A12_y(332,1),A24_y(332,1),A30_y(332,1), ↵
            A36_y(332,1),A42_y(332,1),A48_y(332,1),A54_y(332,1), ↵
            A56_y(332,1),A58_y(332,1),A60_y(332,1),A70_y(332,1)];
125 lamb6_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
126 lamb6_y=[A0_y(380,1),A12_y(380,1),A24_y(380,1),A30_y(380,1), ↵
            A36_y(380,1),A42_y(380,1),A48_y(380,1),A54_y(380,1), ↵
            A56_y(380,1),A58_y(380,1),A60_y(380,1),A70_y(380,1)];
127 lamb7_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
128 lamb7_y=[A0_y(474,1),A12_y(474,1),A24_y(474,1),A30_y(474,1), ↵
            A36_y(474,1),A42_y(474,1),A48_y(474,1),A54_y(474,1), ↵
            A56_y(474,1),A58_y(474,1),A60_y(474,1),A70_y(474,1)];
129 lamb8_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
130 lamb8_y=[A0_y(563,1),A12_y(563,1),A24_y(563,1),A30_y(563,1), ↵
            A36_y(563,1),A42_y(563,1),A48_y(563,1),A54_y(563,1), ↵
            A56_y(563,1),A58_y(563,1),A60_y(563,1),A70_y(563,1)];
131 lamb9_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
132 lamb9_y=[A0_y(759,1),A12_y(759,1),A24_y(759,1),A30_y(759,1), ↵
            A36_y(759,1),A42_y(759,1),A48_y(759,1),A54_y(759,1), ↵
            A56_y(759,1),A58_y(759,1),A60_y(759,1),A70_y(759,1)];
133 lamb10_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15];
134 lamb10_y=[A0_y(1001,1),A12_y(1001,1),A24_y(1001,1),A30_y(1001,1), ↵
            A36_y(1001,1),A42_y(1001,1),A48_y(1001,1),A54_y(1001,1), ↵
            A56_y(1001,1),A58_y(1001,1),A60_y(1001,1),A70_y(1001,1)];
135
136 % Representação da evolução temporal da transmitância do musculo
137 % imerso em Glicerina 75% para certos comprimentos de onda em
138 % larga escala
139 % Figura 2
140 figure
141 plot(lamb1_x,lamb1_y,lamb2_x,lamb2_y,lamb3_x,lamb3_y, ↵
      lamb4_x,lamb4_y,lamb5_x,lamb5_y,lamb6_x,lamb6_y, ↵
      lamb7_x,lamb7_y,lamb8_x,lamb8_y,lamb9_x,lamb9_y, ↵
      lamb10_x,lamb10_y);
142 axis([0 15 8 22]);
143 xlabel('Tempo (minutos)');
144 ylabel('Transmitância (%)');
145 title('Evolução da transmitância espectral para certos ↵
        comprimentos de onda');
146 legend('390nm','420nm','455nm','490nm','510nm','532nm', ↵

```



```

        '575nm','615nm','700nm','800nm');
147
148 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
149 % em todos os espectros em curta escala
150 lambda1_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
151 lambda1_y=[A0_y(82,1),A1_y(82,1),A2_y(82,1),A3_y(82,1),
           A4_y(82,1),A5_y(82,1),A6_y(82,1),A7_y(82,1),
           A8_y(82,1),A9_y(82,1),A10_y(82,1),A11_y(82,1),
           A12_y(82,1),A13_y(82,1),A14_y(82,1),A15_y(82,1),
           A16_y(82,1),A17_y(82,1),A18_y(82,1),A19_y(82,1),
           A20_y(82,1),A21_y(82,1),A22_y(82,1)];
152 lambda2_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
153 lambda2_y=[A0_y(144,1),A1_y(144,1),A2_y(144,1),A3_y(144,1),
           A4_y(144,1),A5_y(144,1),A6_y(144,1),A7_y(144,1),
           A8_y(144,1),A9_y(144,1),A10_y(144,1),A11_y(144,1),
           A12_y(144,1),A13_y(144,1),A14_y(144,1),A15_y(144,1),
           A16_y(144,1),A17_y(144,1),A18_y(144,1),A19_y(144,1),
           A20_y(144,1),A21_y(144,1),A22_y(144,1)];
154 lambda3_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
155 lambda3_y=[A0_y(216,1),A1_y(216,1),A2_y(216,1),A3_y(216,1),
           A4_y(216,1),A5_y(216,1),A6_y(216,1),A7_y(216,1),
           A8_y(216,1),A9_y(216,1),A10_y(216,1),A11_y(216,1),
           A12_y(216,1),A13_y(216,1),A14_y(216,1),A15_y(216,1),
           A16_y(216,1),A17_y(216,1),A18_y(216,1),A19_y(216,1),
           A20_y(216,1),A21_y(216,1),A22_y(216,1)];
156 lambda4_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
157 lambda4_y=[A0_y(290,1),A1_y(290,1),A2_y(290,1),A3_y(290,1),
           A4_y(290,1),A5_y(290,1),A6_y(290,1),A7_y(290,1),
           A8_y(290,1),A9_y(290,1),A10_y(290,1),A11_y(290,1),
           A12_y(290,1),A13_y(290,1),A14_y(290,1),A15_y(290,1),
           A16_y(290,1),A17_y(290,1),A18_y(290,1),A19_y(290,1),
           A20_y(290,1),A21_y(290,1),A22_y(290,1)];
158 lambda5_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
159 lambda5_y=[A0_y(332,1),A1_y(332,1),A2_y(332,1),A3_y(332,1),
           A4_y(332,1),A5_y(332,1),A6_y(332,1),A7_y(332,1),
           A8_y(332,1),A9_y(332,1),A10_y(332,1),A11_y(332,1),
           A12_y(332,1),A13_y(332,1),A14_y(332,1),A15_y(332,1),
           A16_y(332,1),A17_y(332,1),A18_y(332,1),A19_y(332,1),
           A20_y(332,1),A21_y(332,1),A22_y(332,1)];
160 lambda6_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
161 lambda6_y=[A0_y(380,1),A1_y(380,1),A2_y(380,1),A3_y(380,1),
           A4_y(380,1),A5_y(380,1),A6_y(380,1),A7_y(380,1),
           A8_y(380,1),A9_y(380,1),A10_y(380,1),A11_y(380,1),
           A12_y(380,1),A13_y(380,1),A14_y(380,1),A15_y(380,1),
           A16_y(380,1),A17_y(380,1),A18_y(380,1),A19_y(380,1),
           A20_y(380,1),A21_y(380,1),A22_y(380,1)];
162 lambda7_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
           90,95,100,105,110];
163 lambda7_y=[A0_y(474,1),A1_y(474,1),A2_y(474,1),A3_y(474,1),

```

```

        A4_y(474,1),A5_y(474,1),A6_y(474,1),A7_y(474,1), ↵
        A8_y(474,1),A9_y(474,1),A10_y(474,1),A11_y(474,1), ↵
        A12_y(474,1),A13_y(474,1),A14_y(474,1),A15_y(474,1), ↵
        A16_y(474,1),A17_y(474,1),A18_y(474,1),A19_y(474,1), ↵
        A20_y(474,1),A21_y(474,1),A22_y(474,1)];
164 lambda8_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85, ↵
        90,95,100,105,110];
165 lambda8_y=[A0_y(563,1),A1_y(563,1),A2_y(563,1),A3_y(563,1), ↵
        A4_y(563,1),A5_y(563,1),A6_y(563,1),A7_y(563,1), ↵
        A8_y(563,1),A9_y(563,1),A10_y(563,1),A11_y(563,1), ↵
        A12_y(563,1),A13_y(563,1),A14_y(563,1),A15_y(563,1), ↵
        A16_y(563,1),A17_y(563,1),A18_y(563,1),A19_y(563,1), ↵
        A20_y(563,1),A21_y(563,1),A22_y(563,1)];
166 lambda9_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85, ↵
        90,95,100,105,110];
167 lambda9_y=[A0_y(759,1),A1_y(759,1),A2_y(759,1),A3_y(759,1), ↵
        A4_y(759,1),A5_y(759,1),A6_y(759,1),A7_y(759,1), ↵
        A8_y(759,1),A9_y(759,1),A10_y(759,1),A11_y(759,1), ↵
        A12_y(759,1),A13_y(759,1),A14_y(759,1),A15_y(759,1), ↵
        A16_y(759,1),A17_y(759,1),A18_y(759,1),A19_y(759,1), ↵
        A20_y(759,1),A21_y(759,1),A22_y(759,1)];
168 lambda10_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85, ↵
        90,95,100,105,110];
169 lambda10_y=[A0_y(1001,1),A1_y(1001,1),A2_y(1001,1),A3_y(1001,1), ↵
        A4_y(1001,1),A5_y(1001,1),A6_y(1001,1),A7_y(1001,1), ↵
        A8_y(1001,1),A9_y(1001,1),A10_y(1001,1),A11_y(1001,1), ↵
        A12_y(1001,1),A13_y(1001,1),A14_y(1001,1), ↵
        A15_y(1001,1),A16_y(1001,1),A17_y(1001,1), ↵
        A18_y(1001,1),A19_y(1001,1),A20_y(1001,1), ↵
        A21_y(1001,1),A22_y(1001,1)];
170
171 % Representação da evolução temporal da transmitância do musculo
172 % sob efeito da Glicerina 75% para certos comprimentos de onda em
173 % curta escala
174 % Figura 3
175 figure
176 plot(lambda1_x,lambda1_y,lambda2_x,lambda2_y,lambda3_x,lambda3_y,↵
        lambda4_x,lambda4_y,lambda5_x,lambda5_y,lambda6_x,lambda6_y,↵
        lambda7_x,lambda7_y,lambda8_x,lambda8_y,lambda9_x,lambda9_y,↵
        lambda10_x,lambda10_y);
177 axis([0 110 8 20]);
178 xlabel('Tempo (s)');
179 ylabel('Transmitância (%)');
180 title('Evolução da transmitância espectral para certos ↵
        comprimentos de onda');
181 legend('390nm', '420nm', '455nm', '490nm', '510nm', '532nm', ↵
        '575nm', '615nm', '700nm', '800nm');
182
183 % Construção da matriz para representação 3D dos espectros de
184 % transmitância do tecido sob efeito da Glicerina 75%
185
186 % Componente do tempo da matriz
187 zero=A0_x*0;
188 M_t=[zero,zero+5,zero+10,zero+15,zero+20,zero+25,zero+30,zero+35,↵
        zero+40,zero+45,zero+50,zero+55,zero+60,zero+65,zero+70, ↵
        zero+75,zero+80,zero+85,zero+90,zero+95,zero+100,zero+105, ↵
        zero+110];

```

```

189 % Componente de comprimento de onda da matriz
190 M_c=[A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,↵
        A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x,A0_x];
191 % Componente de transmissão da matriz
192 M_tr=[A0_y,A1_y,A2_y,A3_y,A4_y,A5_y,A6_y,A7_y,A8_y,A9_y,A10_y,↵
        A11_y,A12_y,A13_y,A14_y,A15_y,A16_y,A17_y,A18_y,A19_y,↵
        A20_y,A21_y,A22_y];
193
194 % Representação 3-D da evolução temporal do espectro de
195 % transmitância do músculo
196 % Figura 4
197 figure
198 plot3(M_c(50:2000,:),M_t(50:2000,:),M_tr(50:2000,:))
199 axis([365,1100,0,110,5,25]);
200 xlabel('Comprimento de onda (nm)');
201 ylabel('Tempo (s)');
202 zlabel('Transmitância (%)');
203 Title('Evolução temporal da transmitância espectral do músculo ↵
        imerso em Glicerina 75%');

```

## C.2 Programa para representação da evolução temporal média da transmitância para os tecidos estudados em tratamento com diferentes soluções osmóticas

Neste caso, são considerados espectros medidos em 5 estudos independentes onde se mantiveram as condições experimentais. O programa apresentado abaixo é um exemplo dos programas que foram utilizados para processar os espectros medidos nos estudos realizados para cada agente. Este programa tipo, lê os espectros dos 5 estudos realizados para um agente e começa por fazer uma representação espectral típica dos espectros medidos a cada minuto durante o período de tratamento. Tal representação típica é recolhida de um estudo em particular. Depois são escolhidos dos espectros de um estudo os valores correspondentes aos 10 comprimentos de onda seleccionados para representação de uma evolução temporal típica da transmitância verificada nesses valores em nanómetros. Neste gráfico consideram-se pontos de medição a cada minuto. Procede-se da mesma forma para representar a evolução nos 2 primeiros minutos de tratamento para identificação das oscilações iniciais. Depois são calculados os espectros médios de transmitância para cada instante de medição para os 5 estudos realizados. Neste cálculo normalizam-se os espectros em relação à transmitância natural do tecido em cada estudo, para considerar efeitos criados a partir da mesma referência em transmitância. Após este cálculo é também calculado o desvio padrão espectral para cada instante de tempo em que se obtiveram medições. Representa-se a evolução temporal média da transmitância para os 10 comprimentos de onda escolhidos. Esta representação é feita com pontos correspondentes a cada minuto durante o período de

tratamento. É feita depois uma representação análoga para os primeiros 2 minutos de tratamento para identificar as oscilações na transmitância média. Posteriormente fazem-se as representações das curvas de evolução temporal do desvio padrão normalizado à média tanto para a escala de tempo global como para a escala de tempo reduzida correspondente aos 2 primeiros minutos. Estas duas representações dão informação de como se comportam ao longo do tempo, e para cada comprimento de onda escolhido os desvios das medições feitas em cada estudo em relação à média calculada. Finalmente, é feito o cálculo da matriz 3-D para representação da variação temporal dos espectros médios calculados nos dois primeiros minutos de tratamento, onde se podem identificar as oscilações iniciais.

```

1  %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
2  %                                                                 %
3  %   Programa de cálculo dos espectros médio e de desvio padrão %
4  %   para o efeito de transparência temporário criado pela      %
5  %   Glicerina 50%                                             %
6  %   em amostras de músculo da parede abdominal do rato.      %
7  %                                                                 %
8  %   Este efeito foi medido experimentalmente                  %
9  %   em 5 estudos experimentais independentes.                %
10 %                                                                 %
11 % Este programa produz a totalidade dos gráficos para o estudo %
12 %   referente à Glicerina 50%                                %
13 %                                                                 %
14 %                                                                 %
15 %   glycerolmedio.m                                           %
16 %                                                                 %
17 %   autor: Luís Oliveira                                     %
18 %                                                                 %
19 %   Programa desenvolvido no âmbito da Tese de Dissertação    %
20 %   do MEB - Mestrado em Engenharia Biomédica FEUP          %
21 %                                                                 %
22 %                                                                 %
23 %   Orientador: Professor Doutor Armando Lage               %
24 %   Co-Orientador: Professor Doutor M. Pais Clemente        %
25 %                                                                 %
26 %   Consultor: Professor Doutor Valery V. Tuchin            %
27 %                                                                 %
28 %                                                                 %
29 %   © 2006                                                    %
30 %                                                                 %
31 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
32
33 clear all
34 clc
35
36 % Leitura dos espectros medidos no primeiro estudo
37 A0=dlmread('A0.tra','\t',3,0); A1=dlmread('A1.tra','\t',3,0);
38 A2=dlmread('A2.tra','\t',3,0); A3=dlmread('A3.tra','\t',3,0);
39 A4=dlmread('A4.tra','\t',3,0); A5=dlmread('A5.tra','\t',3,0);
40 A6=dlmread('A6.tra','\t',3,0); A7=dlmread('A7.tra','\t',3,0);
41 A8=dlmread('A8.tra','\t',3,0); A9=dlmread('A9.tra','\t',3,0);
42 A10=dlmread('A10.tra','\t',3,0); A11=dlmread('A11.tra','\t',3,0);

```

```

43 A12=dlmread('A12.tra','\t',3,0); A13=dlmread('A13.tra','\t',3,0);
44 A14=dlmread('A14.tra','\t',3,0); A15=dlmread('A15.tra','\t',3,0);
45 A16=dlmread('A16.tra','\t',3,0); A17=dlmread('A17.tra','\t',3,0);
46 A18=dlmread('A18.tra','\t',3,0); A19=dlmread('A19.tra','\t',3,0);
47 A20=dlmread('A20.tra','\t',3,0); A21=dlmread('A21.tra','\t',3,0);
48 A22=dlmread('A22.tra','\t',3,0); A23=dlmread('A23.tra','\t',3,0);
49 A24=dlmread('A24.tra','\t',3,0); A25=dlmread('A25.tra','\t',3,0);
50 A26=dlmread('A26.tra','\t',3,0); A27=dlmread('A27.tra','\t',3,0);
51 A28=dlmread('A28.tra','\t',3,0); A29=dlmread('A29.tra','\t',3,0);
52 A30=dlmread('A30.tra','\t',3,0); A31=dlmread('A31.tra','\t',3,0);
53 A32=dlmread('A32.tra','\t',3,0); A33=dlmread('A33.tra','\t',3,0);
54 A34=dlmread('A34.tra','\t',3,0); A35=dlmread('A35.tra','\t',3,0);
55 A36=dlmread('A36.tra','\t',3,0); A37=dlmread('A37.tra','\t',3,0);
56 A38=dlmread('A38.tra','\t',3,0); A39=dlmread('A39.tra','\t',3,0);
57 A40=dlmread('A40.tra','\t',3,0); A41=dlmread('A41.tra','\t',3,0);
58 A42=dlmread('A42.tra','\t',3,0); A43=dlmread('A43.tra','\t',3,0);
59 A44=dlmread('A44.tra','\t',3,0); A45=dlmread('A45.tra','\t',3,0);
60 A46=dlmread('A46.tra','\t',3,0); A47=dlmread('A47.tra','\t',3,0);
61 A48=dlmread('A48.tra','\t',3,0); A49=dlmread('A49.tra','\t',3,0);
62 A50=dlmread('A50.tra','\t',3,0); A51=dlmread('A51.tra','\t',3,0);
63 A52=dlmread('A52.tra','\t',3,0); A53=dlmread('A53.tra','\t',3,0);
64 A54=dlmread('A54.tra','\t',3,0); A55=dlmread('A55.tra','\t',3,0);
65 A56=dlmread('A56.tra','\t',3,0); A57=dlmread('A57.tra','\t',3,0);
66 A58=dlmread('A58.tra','\t',3,0); A59=dlmread('A59.tra','\t',3,0);
67 A60=dlmread('A60.tra','\t',3,0); A61=dlmread('A61.tra','\t',3,0);
68 A62=dlmread('A62.tra','\t',3,0); A63=dlmread('A63.tra','\t',3,0);
69 A64=dlmread('A64.tra','\t',3,0); A65=dlmread('A65.tra','\t',3,0);
70 A66=dlmread('A66.tra','\t',3,0); A67=dlmread('A67.tra','\t',3,0);
71 A68=dlmread('A68.tra','\t',3,0); A69=dlmread('A69.tra','\t',3,0);
72 A70=dlmread('A70.tra','\t',3,0);
73
74 % Leitura dos espectros medidos no segundo estudo
75 B0=dlmread('B0.tra','\t',3,0); B1=dlmread('B1.tra','\t',3,0);
76 B2=dlmread('B2.tra','\t',3,0); B3=dlmread('B3.tra','\t',3,0);
77 B4=dlmread('B4.tra','\t',3,0); B5=dlmread('B5.tra','\t',3,0);
78 B6=dlmread('B6.tra','\t',3,0); B7=dlmread('B7.tra','\t',3,0);
79 B8=dlmread('B8.tra','\t',3,0); B9=dlmread('B9.tra','\t',3,0);
80 B10=dlmread('B10.tra','\t',3,0); B11=dlmread('B11.tra','\t',3,0);
81 B12=dlmread('B12.tra','\t',3,0); B13=dlmread('B13.tra','\t',3,0);
82 B14=dlmread('B14.tra','\t',3,0); B15=dlmread('B15.tra','\t',3,0);
83 B16=dlmread('B16.tra','\t',3,0); B17=dlmread('B17.tra','\t',3,0);
84 B18=dlmread('B18.tra','\t',3,0); B19=dlmread('B19.tra','\t',3,0);
85 B20=dlmread('B20.tra','\t',3,0); B21=dlmread('B21.tra','\t',3,0);
86 B22=dlmread('B22.tra','\t',3,0); B23=dlmread('B23.tra','\t',3,0);
87 B24=dlmread('B24.tra','\t',3,0); B25=dlmread('B25.tra','\t',3,0);
88 B26=dlmread('B26.tra','\t',3,0); B27=dlmread('B27.tra','\t',3,0);
89 B28=dlmread('B28.tra','\t',3,0); B29=dlmread('B29.tra','\t',3,0);
90 B30=dlmread('B30.tra','\t',3,0); B31=dlmread('B31.tra','\t',3,0);
91 B32=dlmread('B32.tra','\t',3,0); B33=dlmread('B33.tra','\t',3,0);
92 B34=dlmread('B34.tra','\t',3,0); B35=dlmread('B35.tra','\t',3,0);
93 B36=dlmread('B36.tra','\t',3,0); B37=dlmread('B37.tra','\t',3,0);
94 B38=dlmread('B38.tra','\t',3,0); B39=dlmread('B39.tra','\t',3,0);
95 B40=dlmread('B40.tra','\t',3,0); B41=dlmread('B41.tra','\t',3,0);
96 B42=dlmread('B42.tra','\t',3,0); B43=dlmread('B43.tra','\t',3,0);
97 B44=dlmread('B44.tra','\t',3,0); B45=dlmread('B45.tra','\t',3,0);
98 B46=dlmread('B46.tra','\t',3,0); B47=dlmread('B47.tra','\t',3,0);
99 B48=dlmread('B48.tra','\t',3,0); B49=dlmread('B49.tra','\t',3,0);
100 B50=dlmread('B50.tra','\t',3,0); B51=dlmread('B51.tra','\t',3,0);
101 B52=dlmread('B52.tra','\t',3,0); B53=dlmread('B53.tra','\t',3,0);
102 B54=dlmread('B54.tra','\t',3,0); B55=dlmread('B55.tra','\t',3,0);
103 B56=dlmread('B56.tra','\t',3,0); B57=dlmread('B57.tra','\t',3,0);

```

```

104 B58=dlmread('B58.tra','\t',3,0); B59=dlmread('B59.tra','\t',3,0);
105 B60=dlmread('B60.tra','\t',3,0); B61=dlmread('B61.tra','\t',3,0);
106 B62=dlmread('B62.tra','\t',3,0); B63=dlmread('B63.tra','\t',3,0);
107 B64=dlmread('B64.tra','\t',3,0); B65=dlmread('B65.tra','\t',3,0);
108 B66=dlmread('B66.tra','\t',3,0); B67=dlmread('B67.tra','\t',3,0);
109 B68=dlmread('B68.tra','\t',3,0); B69=dlmread('B69.tra','\t',3,0);
110 B70=dlmread('B70.tra','\t',3,0);
111
112 % Leitura dos espectros medidos no terceiro estudo
113 C0=dlmread('C0.tra','\t',3,0); C1=dlmread('C1.tra','\t',3,0);
114 C2=dlmread('C2.tra','\t',3,0); C3=dlmread('C3.tra','\t',3,0);
115 C4=dlmread('C4.tra','\t',3,0); C5=dlmread('C5.tra','\t',3,0);
116 C6=dlmread('C6.tra','\t',3,0); C7=dlmread('C7.tra','\t',3,0);
117 C8=dlmread('C8.tra','\t',3,0); C9=dlmread('C9.tra','\t',3,0);
118 C10=dlmread('C10.tra','\t',3,0); C11=dlmread('C11.tra','\t',3,0);
119 C12=dlmread('C12.tra','\t',3,0); C13=dlmread('C13.tra','\t',3,0);
120 C14=dlmread('C14.tra','\t',3,0); C15=dlmread('C15.tra','\t',3,0);
121 C16=dlmread('C16.tra','\t',3,0); C17=dlmread('C17.tra','\t',3,0);
122 C18=dlmread('C18.tra','\t',3,0); C19=dlmread('C19.tra','\t',3,0);
123 C20=dlmread('C20.tra','\t',3,0); C21=dlmread('C21.tra','\t',3,0);
124 C22=dlmread('C22.tra','\t',3,0); C23=dlmread('C23.tra','\t',3,0);
125 C24=dlmread('C24.tra','\t',3,0); C25=dlmread('C25.tra','\t',3,0);
126 C26=dlmread('C26.tra','\t',3,0); C27=dlmread('C27.tra','\t',3,0);
127 C28=dlmread('C28.tra','\t',3,0); C29=dlmread('C29.tra','\t',3,0);
128 C30=dlmread('C30.tra','\t',3,0); C31=dlmread('C31.tra','\t',3,0);
129 C32=dlmread('C32.tra','\t',3,0); C33=dlmread('C33.tra','\t',3,0);
130 C34=dlmread('C34.tra','\t',3,0); C35=dlmread('C35.tra','\t',3,0);
131 C36=dlmread('C36.tra','\t',3,0); C37=dlmread('C37.tra','\t',3,0);
132 C38=dlmread('C38.tra','\t',3,0); C39=dlmread('C39.tra','\t',3,0);
133 C40=dlmread('C40.tra','\t',3,0); C41=dlmread('C41.tra','\t',3,0);
134 C42=dlmread('C42.tra','\t',3,0); C43=dlmread('C43.tra','\t',3,0);
135 C44=dlmread('C44.tra','\t',3,0); C45=dlmread('C45.tra','\t',3,0);
136 C46=dlmread('C46.tra','\t',3,0); C47=dlmread('C47.tra','\t',3,0);
137 C48=dlmread('C48.tra','\t',3,0); C49=dlmread('C49.tra','\t',3,0);
138 C50=dlmread('C50.tra','\t',3,0); C51=dlmread('C51.tra','\t',3,0);
139 C52=dlmread('C52.tra','\t',3,0); C53=dlmread('C53.tra','\t',3,0);
140 C54=dlmread('C54.tra','\t',3,0); C55=dlmread('C55.tra','\t',3,0);
141 C56=dlmread('C56.tra','\t',3,0); C57=dlmread('C57.tra','\t',3,0);
142 C58=dlmread('C58.tra','\t',3,0); C59=dlmread('C59.tra','\t',3,0);
143 C60=dlmread('C60.tra','\t',3,0); C61=dlmread('C61.tra','\t',3,0);
144 C62=dlmread('C62.tra','\t',3,0); C63=dlmread('C63.tra','\t',3,0);
145 C64=dlmread('C64.tra','\t',3,0); C65=dlmread('C65.tra','\t',3,0);
146 C66=dlmread('C66.tra','\t',3,0); C67=dlmread('C67.tra','\t',3,0);
147 C68=dlmread('C68.tra','\t',3,0); C69=dlmread('C69.tra','\t',3,0);
148 C70=dlmread('C70.tra','\t',3,0);
149
150 % Leitura dos espectros medidos no quarto estudo
151 D0=dlmread('D0.tra','\t',3,0); D1=dlmread('D1.tra','\t',3,0);
152 D2=dlmread('D2.tra','\t',3,0); D3=dlmread('D3.tra','\t',3,0);
153 D4=dlmread('D4.tra','\t',3,0); D5=dlmread('D5.tra','\t',3,0);
154 D6=dlmread('D6.tra','\t',3,0); D7=dlmread('D7.tra','\t',3,0);
155 D8=dlmread('D8.tra','\t',3,0); D9=dlmread('D9.tra','\t',3,0);
156 D10=dlmread('D10.tra','\t',3,0); D11=dlmread('D11.tra','\t',3,0);
157 D12=dlmread('D12.tra','\t',3,0); D13=dlmread('D13.tra','\t',3,0);
158 D14=dlmread('D14.tra','\t',3,0); D15=dlmread('D15.tra','\t',3,0);
159 D16=dlmread('D16.tra','\t',3,0); D17=dlmread('D17.tra','\t',3,0);
160 D18=dlmread('D18.tra','\t',3,0); D19=dlmread('D19.tra','\t',3,0);
161 D20=dlmread('D20.tra','\t',3,0); D21=dlmread('D21.tra','\t',3,0);
162 D22=dlmread('D22.tra','\t',3,0); D23=dlmread('D23.tra','\t',3,0);
163 D24=dlmread('D24.tra','\t',3,0); D25=dlmread('D25.tra','\t',3,0);
163 D26=dlmread('D26.tra','\t',3,0); D27=dlmread('D27.tra','\t',3,0);

```

```

164 D28=dlmread('D28.tra','\t',3,0); D29=dlmread('D29.tra','\t',3,0);
165 D30=dlmread('D30.tra','\t',3,0); D31=dlmread('D31.tra','\t',3,0);
166 D32=dlmread('D32.tra','\t',3,0); D33=dlmread('D33.tra','\t',3,0);
167 D34=dlmread('D34.tra','\t',3,0); D35=dlmread('D35.tra','\t',3,0);
168 D36=dlmread('D36.tra','\t',3,0); D37=dlmread('D37.tra','\t',3,0);
169 D38=dlmread('D38.tra','\t',3,0); D39=dlmread('D39.tra','\t',3,0);
170 D40=dlmread('D40.tra','\t',3,0); D41=dlmread('D41.tra','\t',3,0);
171 D42=dlmread('D42.tra','\t',3,0); D43=dlmread('D43.tra','\t',3,0);
172 D44=dlmread('D44.tra','\t',3,0); D45=dlmread('D45.tra','\t',3,0);
173 D46=dlmread('D46.tra','\t',3,0); D47=dlmread('D47.tra','\t',3,0);
174 D48=dlmread('D48.tra','\t',3,0); D49=dlmread('D49.tra','\t',3,0);
175 D50=dlmread('D50.tra','\t',3,0); D51=dlmread('D51.tra','\t',3,0);
176 D52=dlmread('D52.tra','\t',3,0); D53=dlmread('D53.tra','\t',3,0);
177 D54=dlmread('D54.tra','\t',3,0); D55=dlmread('D55.tra','\t',3,0);
178 D56=dlmread('D56.tra','\t',3,0); D57=dlmread('D57.tra','\t',3,0);
179 D58=dlmread('D58.tra','\t',3,0); D59=dlmread('D59.tra','\t',3,0);
180 D60=dlmread('D60.tra','\t',3,0); D61=dlmread('D61.tra','\t',3,0);
181 D62=dlmread('D62.tra','\t',3,0); D63=dlmread('D63.tra','\t',3,0);
182 D64=dlmread('D64.tra','\t',3,0); D65=dlmread('D65.tra','\t',3,0);
183 D66=dlmread('D66.tra','\t',3,0); D67=dlmread('D67.tra','\t',3,0);
184 D68=dlmread('D68.tra','\t',3,0); D69=dlmread('D69.tra','\t',3,0);
185 D70=dlmread('D70.tra','\t',3,0);
186
187 %% Leitura dos espectros medidos no quinto estudo
188 E0=dlmread('E0.tra','\t',3,0); E1=dlmread('E1.tra','\t',3,0);
189 E2=dlmread('E2.tra','\t',3,0); E3=dlmread('E3.tra','\t',3,0);
190 E4=dlmread('E4.tra','\t',3,0); E5=dlmread('E5.tra','\t',3,0);
191 E6=dlmread('E6.tra','\t',3,0); E7=dlmread('E7.tra','\t',3,0);
192 E8=dlmread('E8.tra','\t',3,0); E9=dlmread('E9.tra','\t',3,0);
193 E10=dlmread('E10.tra','\t',3,0); E11=dlmread('E11.tra','\t',3,0);
194 E12=dlmread('E12.tra','\t',3,0); E13=dlmread('E13.tra','\t',3,0);
195 E14=dlmread('E14.tra','\t',3,0); E15=dlmread('E15.tra','\t',3,0);
196 E16=dlmread('E16.tra','\t',3,0); E17=dlmread('E17.tra','\t',3,0);
197 E18=dlmread('E18.tra','\t',3,0); E19=dlmread('E19.tra','\t',3,0);
198 E20=dlmread('E20.tra','\t',3,0); E21=dlmread('E21.tra','\t',3,0);
199 E22=dlmread('E22.tra','\t',3,0); E23=dlmread('E23.tra','\t',3,0);
200 E24=dlmread('E24.tra','\t',3,0); E25=dlmread('E25.tra','\t',3,0);
201 E26=dlmread('E26.tra','\t',3,0); E27=dlmread('E27.tra','\t',3,0);
202 E28=dlmread('E28.tra','\t',3,0); E29=dlmread('E29.tra','\t',3,0);
203 E30=dlmread('E30.tra','\t',3,0); E31=dlmread('E31.tra','\t',3,0);
204 E32=dlmread('E32.tra','\t',3,0); E33=dlmread('E33.tra','\t',3,0);
205 E34=dlmread('E34.tra','\t',3,0); E35=dlmread('E35.tra','\t',3,0);
206 E36=dlmread('E36.tra','\t',3,0); E37=dlmread('E37.tra','\t',3,0);
207 E38=dlmread('E38.tra','\t',3,0); E39=dlmread('E39.tra','\t',3,0);
208 E40=dlmread('E40.tra','\t',3,0); E41=dlmread('E41.tra','\t',3,0);
209 E42=dlmread('E42.tra','\t',3,0); E43=dlmread('E43.tra','\t',3,0);
210 E44=dlmread('E44.tra','\t',3,0); E45=dlmread('E45.tra','\t',3,0);
211 E46=dlmread('E46.tra','\t',3,0); E47=dlmread('E47.tra','\t',3,0);
212 E48=dlmread('E48.tra','\t',3,0); E49=dlmread('E49.tra','\t',3,0);
213 E50=dlmread('E50.tra','\t',3,0); E51=dlmread('E51.tra','\t',3,0);
214 E52=dlmread('E52.tra','\t',3,0); E53=dlmread('E53.tra','\t',3,0);
215 E54=dlmread('E54.tra','\t',3,0); E55=dlmread('E55.tra','\t',3,0);
216 E56=dlmread('E56.tra','\t',3,0); E57=dlmread('E57.tra','\t',3,0);
217 E58=dlmread('E58.tra','\t',3,0); E59=dlmread('E59.tra','\t',3,0);
218 E60=dlmread('E60.tra','\t',3,0); E61=dlmread('E61.tra','\t',3,0);
219 E62=dlmread('E62.tra','\t',3,0); E63=dlmread('E63.tra','\t',3,0);
220 E64=dlmread('E64.tra','\t',3,0); E65=dlmread('E65.tra','\t',3,0);
221 E66=dlmread('E66.tra','\t',3,0); E67=dlmread('E67.tra','\t',3,0);
222 E68=dlmread('E68.tra','\t',3,0); E69=dlmread('E69.tra','\t',3,0);
223 E70=dlmread('E70.tra','\t',3,0);
224

```



```

225 % Criação do eixo X comum para todas as representações de
226 % espectros
227 x=A0(:,1);
228
229 % Figura 1
230 % Representação de uma evolução espectral típica (de um dos
231 % estudos). Pontos representados respeitantes a medições a cada
232 % minuto para representação do efeito global criado
233 figure
234 plot(x,A0(:,2),x,A12(:,2),x,A30(:,2),x,A42(:,2),x,A54(:,2), ↵
      x,A58(:,2),x,A62(:,2),x,A66(:,2),x,A70(:,2))
235 axis([370 900 8 26]);
236 xlabel('Comprimento de onda (nm)')
237 ylabel('Transmitância (%)')
238 legend('Tecido natural','1 minuto','3 minutos','5 minutos', ↵
      '7 minutos','9 minutos','11 minutos','13 minutos', ↵
      '15 minutos','17 minutos','19 minutos','21 minutos', ↵
      '23 minutos','25 minutos','27 minutos','29 minutos');
239 Title('Evolução temporal típica da transmitância do músculo ↵
      imerso em Glicerina 50%')
240
241 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
242 % em todos os espectros de diferentes instantes de tempo para
243 % representação da evolução da transmitância numa escala de tempo
244 % longa
245 tg=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15];
246 t1g=[A0(82,2),A12(82,2),A24(82,2),A30(82,2),A36(82,2),A42(82,2), ↵
      A48(82,2),A54(82,2),A56(82,2),A58(82,2),A60(82,2),A62(82,2), ↵
      A64(82,2),A66(82,2),A68(82,2),A70(82,2)];
247 t2g=[A0(144,2),A12(144,2),A24(144,2),A30(144,2),A36(144,2), ↵
      A42(144,2),A48(144,2),A54(144,2),A56(144,2),A58(144,2), ↵
      A60(144,2),A62(144,2),A64(144,2),A66(144,2), ↵
      A68(144,2),A70(144,2)];
248 t3g=[A0(216,2),A12(216,2),A24(216,2),A30(216,2),A36(216,2), ↵
      A42(216,2),A48(216,2),A54(216,2),A56(216,2),A58(216,2), ↵
      A60(216,2),A62(216,2),A64(216,2),A66(216,2),A68(216,2), ↵
      A70(216,2)];
249 t4g=[A0(290,2),A12(290,2),A24(290,2),A30(290,2),A36(290,2), ↵
      A42(290,2),A48(290,2),A54(290,2),A56(290,2),A58(290,2), ↵
      A60(290,2),A62(290,2),A64(290,2),A66(290,2),A68(290,2), ↵
      A70(290,2)];
250 t5g=[A0(332,2),A12(332,2),A24(332,2),A30(332,2),A36(332,2), ↵
      A42(332,2),A48(332,2),A54(332,2),A56(332,2),A58(332,2), ↵
      A60(332,2),A62(332,2),A64(332,2),A66(332,2),A68(332,2), ↵
      A70(332,2)];
251 t6g=[A0(380,2),A12(380,2),A24(380,2),A30(380,2),A36(380,2), ↵
      A42(380,2),A48(380,2),A54(380,2),A56(380,2),A58(380,2), ↵
      A60(380,2),A62(380,2),A64(380,2),A66(380,2),A68(380,2), ↵
      A70(380,2)];
252 t7g=[A0(474,2),A12(474,2),A24(474,2),A30(474,2),A36(474,2), ↵
      A42(474,2),A48(474,2),A54(474,2),A56(474,2),A58(474,2), ↵
      A60(474,2),A62(474,2),A64(474,2),A66(474,2),A68(474,2), ↵
      A70(474,2)];
253 t8g=[A0(563,2),A12(563,2),A24(563,2),A30(563,2),A36(563,2), ↵
      A42(563,2),A48(563,2),A54(563,2),A56(563,2),A58(563,2), ↵
      A60(563,2),A62(563,2),A64(563,2),A66(563,2),A68(563,2), ↵
      A70(563,2)];

```



```

254 t9g=[A0(759,2),A12(759,2),A24(759,2),A30(759,2),A36(759,2), ↵
      A42(759,2),A48(759,2),A54(759,2),A56(759,2),A58(759,2), ↵
      A60(759,2),A62(759,2),A64(759,2),A66(759,2),A68(759,2), ↵
      A70(759,2)];
255 t10g=[A0(1001,2),A12(1001,2),A24(1001,2),A30(1001,2), ↵
      A36(1001,2),A42(1001,2),A48(1001,2),A54(1001,2), ↵
      A56(1001,2),A58(1001,2),A60(1001,2),A62(1001,2), ↵
      A64(1001,2),A66(1001,2),A68(1001,2),A70(1001,2)];
256
257 % Representação da evolução temporal da transmitância do músculo
258 % sob efeito da Glicerina 50% para certos comprimentos de onda em
259 % escala longa de tempo
260 % Figura 2
261 figure
262 plot(tg,t1g,tg,t2g,tg,t3g,tg,t4g,tg,t5g,tg,t6g,tg,t7g,tg,t8g, ↵
      tg,t9g,tg,t10g);
263 axis([0 30 8 25]);
264 xlabel('Tempo (minutos)');
265 ylabel('Transmitância (%)')
266 title('Evolução temporal típica da transmitância para certos ↵
      comprimentos de onda')
267 legend('390nm' , '420nm' , '455nm' , '490nm' , '510nm' , '532nm' , ↵
      '575nm' , '615nm' , '700nm' , '800nm');
268
269 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
270 % em todos os espectros de diferentes instantes de tempo para
271 % representação das oscilações iniciais verificadas
272 tc=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95, ↵
      100,105,110,115,120];
273 t1c=[A0(82,2),A1(82,2),A2(82,2),A3(82,2),A4(82,2),A5(82,2), ↵
      A6(82,2),A7(82,2),A8(82,2),A9(82,2),A10(82,2),A11(82,2), ↵
      A12(82,2),A13(82,2),A14(82,2),A15(82,2),A16(82,2),A17(82,2), ↵
      A18(82,2),A19(82,2),A20(82,2),A21(82,2),A22(82,2),A23(82,2), ↵
      A24(82,2)];
274 t2c=[A0(144,2),A1(144,2),A2(144,2),A3(144,2),A4(144,2),A5(144,2), ↵
      A6(144,2),A7(144,2),A8(144,2),A9(144,2),A10(144,2), ↵
      A11(144,2),A12(144,2),A13(144,2),A14(144,2),A15(144,2), ↵
      A16(144,2),A17(144,2),A18(144,2),A19(144,2),A20(144,2), ↵
      A21(144,2),A22(144,2),A23(144,2),A24(144,2)];
275 t3c=[A0(216,2),A1(216,2),A2(216,2),A3(216,2),A4(216,2),A5(216,2), ↵
      A6(216,2),A7(216,2),A8(216,2),A9(216,2),A10(216,2), ↵
      A11(216,2),A12(216,2),A13(216,2),A14(216,2),A15(216,2), ↵
      A16(216,2),A17(216,2),A18(216,2),A19(216,2),A20(216,2), ↵
      A21(216,2),A22(216,2),A23(216,2),A24(216,2)];
276 t4c=[A0(290,2),A1(290,2),A2(290,2),A3(290,2),A4(290,2),A5(290,2), ↵
      A6(290,2),A7(290,2),A8(290,2),A9(290,2),A10(290,2), ↵
      A11(290,2),A12(290,2),A13(290,2),A14(290,2),A15(290,2), ↵
      A16(290,2),A17(290,2),A18(290,2),A19(290,2),A20(290,2), ↵
      A21(290,2),A22(290,2),A23(290,2),A24(290,2)];
277 t5c=[A0(332,2),A1(332,2),A2(332,2),A3(332,2),A4(332,2),A5(332,2), ↵
      A6(332,2),A7(332,2),A8(332,2),A9(332,2),A10(332,2), ↵
      A11(332,2),A12(332,2),A13(332,2),A14(332,2),A15(332,2), ↵
      A16(332,2),A17(332,2),A18(332,2),A19(332,2),A20(332,2), ↵
      A21(332,2),A22(332,2),A23(332,2),A24(332,2)];
278 t6c=[A0(380,2),A1(380,2),A2(380,2),A3(380,2),A4(380,2),A5(380,2), ↵
      A6(380,2),A7(380,2),A8(380,2),A9(380,2),A10(380,2), ↵

```

```

A11(380,2),A12(380,2),A13(380,2),A14(380,2),A15(380,2), ↵
A16(380,2),A17(380,2),A18(380,2),A19(380,2),A20(380,2), ↵
A21(380,2),A22(380,2),A23(380,2),A24(380,2)];
279 t7c=[A0(474,2),A1(474,2),A2(474,2),A3(474,2),A4(474,2),A5(474,2), ↵
A6(474,2),A7(474,2),A8(474,2),A9(474,2),A10(474,2), ↵
A11(474,2),A12(474,2),A13(474,2),A14(474,2),A15(474,2), ↵
A16(474,2),A17(474,2),A18(474,2),A19(474,2),A20(474,2), ↵
A21(474,2),A22(474,2),A23(474,2),A24(474,2)];
280 t8c=[A0(563,2),A1(563,2),A2(563,2),A3(563,2),A4(563,2),A5(563,2), ↵
A6(563,2),A7(563,2),A8(563,2),A9(563,2),A10(563,2), ↵
A11(563,2),A12(563,2),A13(563,2),A14(563,2),A15(563,2), ↵
A16(563,2),A17(563,2),A18(563,2),A19(563,2),A20(563,2), ↵
A21(563,2),A22(563,2),A23(563,2),A24(563,2)];
281 t9c=[A0(759,2),A1(759,2),A2(759,2),A3(759,2),A4(759,2),A5(759,2), ↵
A6(759,2),A7(759,2),A8(759,2),A9(759,2),A10(759,2), ↵
A11(759,2),A12(759,2),A13(759,2),A14(759,2),A15(759,2), ↵
A16(759,2),A17(759,2),A18(759,2),A19(759,2),A20(759,2), ↵
A21(759,2),A22(759,2),A23(759,2),A24(759,2)];
282 t10c=[A0(1001,2),A1(1001,2),A2(1001,2),A3(1001,2),A4(1001,2), ↵
A5(1001,2),A6(1001,2),A7(1001,2),A8(1001,2),A9(1001,2), ↵
A10(1001,2),A11(1001,2),A12(1001,2),A13(1001,2), ↵
A14(1001,2),A15(1001,2),A16(1001,2),A17(1001,2), ↵
A18(1001,2),A19(1001,2),A20(1001,2),A21(1001,2), ↵
A22(1001,2),A23(1001,2),A24(1001,2)];
283
284 % Representação das oscilações iniciais ocorridas na transmitância
285 % medida do musculo imerso em Glicerina 50%
286 % Figura 3
287 figure
288 plot(tc,t1c,tc,t2c,tc,t3c,tc,t4c,tc,t5c,tc,t6c,tc,t7c,tc,t8c, ↵
tc,t9c,tc,t10c);
289 axis([0 120 8 20]);
290 xlabel('Tempo (segundos)');
291 ylabel('Transmitância (%)')
292 title('Evolução temporal típica da transmitância para certos ↵
comprimentos de onda nos primeiros dois minutos')
293 legend('390nm' , '420nm' , '455nm' , '490nm' , '510nm' , '532nm' , ↵
'575nm' , '615nm' , '700nm' , '800nm');
294
295 % Criação das matrizes com espectros medidos no mesmo instante de
296 % tempo para posterior cálculo dos espectros médio em cada
297 % instante de medição
298 t0=[A0(:,2)./A0(:,2),B0(:,2)./B0(:,2),C0(:,2)./C0(:,2), ↵
D0(:,2)./D0(:,2),E0(:,2)./E0(:,2)];
299 t1=[A1(:,2)./A0(:,2),B1(:,2)./B0(:,2),C1(:,2)./C0(:,2), ↵
D1(:,2)./D0(:,2),E1(:,2)./E0(:,2)];
300 t2=[A2(:,2)./A0(:,2),B2(:,2)./B0(:,2),C2(:,2)./C0(:,2), ↵
D2(:,2)./D0(:,2),E2(:,2)./E0(:,2)];
301 t3=[A3(:,2)./A0(:,2),B3(:,2)./B0(:,2),C3(:,2)./C0(:,2), ↵
D3(:,2)./D0(:,2),E3(:,2)./E0(:,2)];
302 t4=[A4(:,2)./A0(:,2),B4(:,2)./B0(:,2),C4(:,2)./C0(:,2), ↵
D4(:,2)./D0(:,2),E4(:,2)./E0(:,2)];
303 t5=[A5(:,2)./A0(:,2),B5(:,2)./B0(:,2),C5(:,2)./C0(:,2), ↵
D5(:,2)./D0(:,2),E5(:,2)./E0(:,2)];
304 t6=[A6(:,2)./A0(:,2),B6(:,2)./B0(:,2),C6(:,2)./C0(:,2), ↵
D6(:,2)./D0(:,2),E6(:,2)./E0(:,2)];
305 t7=[A7(:,2)./A0(:,2),B7(:,2)./B0(:,2),C7(:,2)./C0(:,2), ↵

```

```

D7(:,2)./D0(:,2),E7(:,2)./E0(:,2)];
306 t8=[A8(:,2)./A0(:,2),B8(:,2)./B0(:,2),C8(:,2)./C0(:,2), ↵
      D8(:,2)./D0(:,2),E8(:,2)./E0(:,2)];
307 t9=[A9(:,2)./A0(:,2),B9(:,2)./B0(:,2),C9(:,2)./C0(:,2), ↵
      D9(:,2)./D0(:,2),E9(:,2)./E0(:,2)];
308 t10=[A10(:,2)./A0(:,2),B10(:,2)./B0(:,2),C10(:,2)./C0(:,2), ↵
      D10(:,2)./D0(:,2),E10(:,2)./E0(:,2)];
309 t11=[A11(:,2)./A0(:,2),B11(:,2)./B0(:,2),C11(:,2)./C0(:,2), ↵
      D11(:,2)./D0(:,2),E11(:,2)./E0(:,2)];
310 t12=[A12(:,2)./A0(:,2),B12(:,2)./B0(:,2),C12(:,2)./C0(:,2), ↵
      D12(:,2)./D0(:,2),E12(:,2)./E0(:,2)];
311 t13=[A13(:,2)./A0(:,2),B13(:,2)./B0(:,2),C13(:,2)./C0(:,2), ↵
      D13(:,2)./D0(:,2),E13(:,2)./E0(:,2)];
312 t14=[A14(:,2)./A0(:,2),B14(:,2)./B0(:,2),C14(:,2)./C0(:,2), ↵
      D14(:,2)./D0(:,2),E14(:,2)./E0(:,2)];
313 t15=[A15(:,2)./A0(:,2),B15(:,2)./B0(:,2),C15(:,2)./C0(:,2), ↵
      D15(:,2)./D0(:,2),E15(:,2)./E0(:,2)];
314 t16=[A16(:,2)./A0(:,2),B16(:,2)./B0(:,2),C16(:,2)./C0(:,2), ↵
      D16(:,2)./D0(:,2),E16(:,2)./E0(:,2)];
315 t17=[A17(:,2)./A0(:,2),B17(:,2)./B0(:,2),C17(:,2)./C0(:,2), ↵
      D17(:,2)./D0(:,2),E17(:,2)./E0(:,2)];
316 t18=[A18(:,2)./A0(:,2),B18(:,2)./B0(:,2),C18(:,2)./C0(:,2), ↵
      D18(:,2)./D0(:,2),E18(:,2)./E0(:,2)];
317 t19=[A19(:,2)./A0(:,2),B19(:,2)./B0(:,2),C19(:,2)./C0(:,2), ↵
      D19(:,2)./D0(:,2),E19(:,2)./E0(:,2)];
318 t20=[A20(:,2)./A0(:,2),B20(:,2)./B0(:,2),C20(:,2)./C0(:,2), ↵
      D20(:,2)./D0(:,2),E20(:,2)./E0(:,2)];
319 t21=[A21(:,2)./A0(:,2),B21(:,2)./B0(:,2),C21(:,2)./C0(:,2), ↵
      D21(:,2)./D0(:,2),E21(:,2)./E0(:,2)];
320 t22=[A22(:,2)./A0(:,2),B22(:,2)./B0(:,2),C22(:,2)./C0(:,2), ↵
      D22(:,2)./D0(:,2),E22(:,2)./E0(:,2)];
321 t23=[A23(:,2)./A0(:,2),B23(:,2)./B0(:,2),C23(:,2)./C0(:,2), ↵
      D23(:,2)./D0(:,2),E23(:,2)./E0(:,2)];
322 t24=[A24(:,2)./A0(:,2),B24(:,2)./B0(:,2),C24(:,2)./C0(:,2), ↵
      D24(:,2)./D0(:,2),E24(:,2)./E0(:,2)];
323 t25=[A25(:,2)./A0(:,2),B25(:,2)./B0(:,2),C25(:,2)./C0(:,2), ↵
      D25(:,2)./D0(:,2),E25(:,2)./E0(:,2)];
324 t26=[A26(:,2)./A0(:,2),B26(:,2)./B0(:,2),C26(:,2)./C0(:,2), ↵
      D26(:,2)./D0(:,2),E26(:,2)./E0(:,2)];
325 t27=[A27(:,2)./A0(:,2),B27(:,2)./B0(:,2),C27(:,2)./C0(:,2), ↵
      D27(:,2)./D0(:,2),E27(:,2)./E0(:,2)];
326 t28=[A28(:,2)./A0(:,2),B28(:,2)./B0(:,2),C28(:,2)./C0(:,2), ↵
      D28(:,2)./D0(:,2),E28(:,2)./E0(:,2)];
327 t29=[A29(:,2)./A0(:,2),B29(:,2)./B0(:,2),C29(:,2)./C0(:,2), ↵
      D29(:,2)./D0(:,2),E29(:,2)./E0(:,2)];
328 t30=[A30(:,2)./A0(:,2),B30(:,2)./B0(:,2),C30(:,2)./C0(:,2), ↵
      D30(:,2)./D0(:,2),E30(:,2)./E0(:,2)];
329 t31=[A31(:,2)./A0(:,2),B31(:,2)./B0(:,2),C31(:,2)./C0(:,2), ↵
      D31(:,2)./D0(:,2),E31(:,2)./E0(:,2)];
330 t32=[A32(:,2)./A0(:,2),B32(:,2)./B0(:,2),C32(:,2)./C0(:,2), ↵
      D32(:,2)./D0(:,2),E32(:,2)./E0(:,2)];
331 t33=[A33(:,2)./A0(:,2),B33(:,2)./B0(:,2),C33(:,2)./C0(:,2), ↵
      D33(:,2)./D0(:,2),E33(:,2)./E0(:,2)];
332 t34=[A34(:,2)./A0(:,2),B34(:,2)./B0(:,2),C34(:,2)./C0(:,2), ↵
      D34(:,2)./D0(:,2),E34(:,2)./E0(:,2)];
333 t35=[A35(:,2)./A0(:,2),B35(:,2)./B0(:,2),C35(:,2)./C0(:,2), ↵
      D35(:,2)./D0(:,2),E35(:,2)./E0(:,2)];

```

```

334 t36=[A36(:,2)./A0(:,2),B36(:,2)./B0(:,2),C36(:,2)./C0(:,2),
        D36(:,2)./D0(:,2),E36(:,2)./E0(:,2)];
335 t37=[A37(:,2)./A0(:,2),B37(:,2)./B0(:,2),C37(:,2)./C0(:,2),
        D37(:,2)./D0(:,2),E37(:,2)./E0(:,2)];
336 t38=[A38(:,2)./A0(:,2),B38(:,2)./B0(:,2),C38(:,2)./C0(:,2),
        D38(:,2)./D0(:,2),E38(:,2)./E0(:,2)];
337 t39=[A39(:,2)./A0(:,2),B39(:,2)./B0(:,2),C39(:,2)./C0(:,2),
        D39(:,2)./D0(:,2),E39(:,2)./E0(:,2)];
338 t40=[A40(:,2)./A0(:,2),B40(:,2)./B0(:,2),C40(:,2)./C0(:,2),
        D40(:,2)./D0(:,2),E40(:,2)./E0(:,2)];
339 t41=[A41(:,2)./A0(:,2),B41(:,2)./B0(:,2),C41(:,2)./C0(:,2),
        D41(:,2)./D0(:,2),E41(:,2)./E0(:,2)];
340 t42=[A42(:,2)./A0(:,2),B42(:,2)./B0(:,2),C42(:,2)./C0(:,2),
        D42(:,2)./D0(:,2),E42(:,2)./E0(:,2)];
341 t43=[A43(:,2)./A0(:,2),B43(:,2)./B0(:,2),C43(:,2)./C0(:,2),
        D43(:,2)./D0(:,2),E43(:,2)./E0(:,2)];
342 t44=[A44(:,2)./A0(:,2),B44(:,2)./B0(:,2),C44(:,2)./C0(:,2),
        D44(:,2)./D0(:,2),E44(:,2)./E0(:,2)];
343 t45=[A45(:,2)./A0(:,2),B45(:,2)./B0(:,2),C45(:,2)./C0(:,2),
        D45(:,2)./D0(:,2),E45(:,2)./E0(:,2)];
344 t46=[A46(:,2)./A0(:,2),B46(:,2)./B0(:,2),C46(:,2)./C0(:,2),
        D46(:,2)./D0(:,2),E46(:,2)./E0(:,2)];
345 t47=[A47(:,2)./A0(:,2),B47(:,2)./B0(:,2),C47(:,2)./C0(:,2),
        D47(:,2)./D0(:,2),E47(:,2)./E0(:,2)];
346 t48=[A48(:,2)./A0(:,2),B48(:,2)./B0(:,2),C48(:,2)./C0(:,2),
        D48(:,2)./D0(:,2),E48(:,2)./E0(:,2)];
347 t49=[A49(:,2)./A0(:,2),B49(:,2)./B0(:,2),C49(:,2)./C0(:,2),
        D49(:,2)./D0(:,2),E49(:,2)./E0(:,2)];
348 t50=[A50(:,2)./A0(:,2),B50(:,2)./B0(:,2),C50(:,2)./C0(:,2),
        D50(:,2)./D0(:,2),E50(:,2)./E0(:,2)];
349 t51=[A51(:,2)./A0(:,2),B51(:,2)./B0(:,2),C51(:,2)./C0(:,2),
        D51(:,2)./D0(:,2),E51(:,2)./E0(:,2)];
350 t52=[A52(:,2)./A0(:,2),B52(:,2)./B0(:,2),C52(:,2)./C0(:,2),
        D52(:,2)./D0(:,2),E52(:,2)./E0(:,2)];
351 t53=[A53(:,2)./A0(:,2),B53(:,2)./B0(:,2),C53(:,2)./C0(:,2),
        D53(:,2)./D0(:,2),E53(:,2)./E0(:,2)];
352 t54=[A54(:,2)./A0(:,2),B54(:,2)./B0(:,2),C54(:,2)./C0(:,2),
        D54(:,2)./D0(:,2),E54(:,2)./E0(:,2)];
353 t55=[A55(:,2)./A0(:,2),B55(:,2)./B0(:,2),C55(:,2)./C0(:,2),
        D55(:,2)./D0(:,2),E55(:,2)./E0(:,2)];
354 t56=[A56(:,2)./A0(:,2),B56(:,2)./B0(:,2),C56(:,2)./C0(:,2),
        D56(:,2)./D0(:,2),E56(:,2)./E0(:,2)];
355 t57=[A57(:,2)./A0(:,2),B57(:,2)./B0(:,2),C57(:,2)./C0(:,2),
        D57(:,2)./D0(:,2),E57(:,2)./E0(:,2)];
356 t58=[A58(:,2)./A0(:,2),B58(:,2)./B0(:,2),C58(:,2)./C0(:,2),
        D58(:,2)./D0(:,2),E58(:,2)./E0(:,2)];
357 t59=[A59(:,2)./A0(:,2),B59(:,2)./B0(:,2),C59(:,2)./C0(:,2),
        D59(:,2)./D0(:,2),E59(:,2)./E0(:,2)];
358 t60=[A60(:,2)./A0(:,2),B60(:,2)./B0(:,2),C60(:,2)./C0(:,2),
        D60(:,2)./D0(:,2),E60(:,2)./E0(:,2)];
359 t61=[A61(:,2)./A0(:,2),B61(:,2)./B0(:,2),C61(:,2)./C0(:,2),
        D61(:,2)./D0(:,2),E61(:,2)./E0(:,2)];
360 t62=[A62(:,2)./A0(:,2),B62(:,2)./B0(:,2),C62(:,2)./C0(:,2),
        D62(:,2)./D0(:,2),E62(:,2)./E0(:,2)];
361 t63=[A63(:,2)./A0(:,2),B63(:,2)./B0(:,2),C63(:,2)./C0(:,2),
        D63(:,2)./D0(:,2),E63(:,2)./E0(:,2)];
362 t64=[A64(:,2)./A0(:,2),B64(:,2)./B0(:,2),C64(:,2)./C0(:,2),

```

```

        D64(:,2)./D0(:,2),E64(:,2)./E0(:,2)];
363 t65=[A65(:,2)./A0(:,2),B65(:,2)./B0(:,2),C65(:,2)./C0(:,2),
        D65(:,2)./D0(:,2),E65(:,2)./E0(:,2)];
364 t66=[A66(:,2)./A0(:,2),B66(:,2)./B0(:,2),C66(:,2)./C0(:,2),
        D66(:,2)./D0(:,2),E66(:,2)./E0(:,2)];
365 t67=[A67(:,2)./A0(:,2),B67(:,2)./B0(:,2),C67(:,2)./C0(:,2),
        D67(:,2)./D0(:,2),E67(:,2)./E0(:,2)];
366 t68=[A68(:,2)./A0(:,2),B68(:,2)./B0(:,2),C68(:,2)./C0(:,2),
        D68(:,2)./D0(:,2),E68(:,2)./E0(:,2)];
367 t69=[A69(:,2)./A0(:,2),B69(:,2)./B0(:,2),C69(:,2)./C0(:,2),
        D69(:,2)./D0(:,2),E69(:,2)./E0(:,2)];
368 t70=[A70(:,2)./A0(:,2),B70(:,2)./B0(:,2),C70(:,2)./C0(:,2),
        D70(:,2)./D0(:,2),E70(:,2)./E0(:,2)];
369
370 % cálculo da média espectral para cada instante de medição
371 m0=mean(t0'); m1=mean(t1'); m2=mean(t2'); m3=mean(t3');
372 m4=mean(t4'); m5=mean(t5'); m6=mean(t6'); m7=mean(t7');
373 m8=mean(t8'); m9=mean(t9'); m10=mean(t10'); m11=mean(t11');
374 m12=mean(t12'); m13=mean(t13'); m14=mean(t14'); m15=mean(t15');
375 m16=mean(t16'); m17=mean(t17'); m18=mean(t18'); m19=mean(t19');
376 m20=mean(t20'); m21=mean(t21'); m22=mean(t22'); m23=mean(t23');
377 m24=mean(t24'); m25=mean(t25'); m26=mean(t26'); m27=mean(t27');
378 m28=mean(t28'); m29=mean(t29'); m30=mean(t30'); m31=mean(t31');
379 m32=mean(t32'); m33=mean(t33'); m34=mean(t34'); m35=mean(t35');
380 m36=mean(t36'); m37=mean(t37'); m38=mean(t38'); m39=mean(t39');
381 m40=mean(t40'); m41=mean(t41'); m42=mean(t42'); m43=mean(t43');
382 m44=mean(t44'); m45=mean(t45'); m46=mean(t46'); m47=mean(t47');
383 m48=mean(t48'); m49=mean(t49'); m50=mean(t50'); m51=mean(t51');
384 m52=mean(t52'); m53=mean(t53'); m54=mean(t54'); m55=mean(t55');
385 m56=mean(t56'); m57=mean(t57'); m58=mean(t58'); m59=mean(t59');
386 m60=mean(t60'); m61=mean(t61'); m62=mean(t62'); m63=mean(t63');
387 m64=mean(t64'); m65=mean(t65'); m66=mean(t66'); m67=mean(t67');
388 m68=mean(t68'); m69=mean(t69'); m70=mean(t70');
389
390 % cálculo dos espectros de desvio padrão ao longo do tempo
391 s0=std(t0,0,2); s1=std(t1,0,2); s2=std(t2,0,2); s3=std(t3,0,2);
392 s4=std(t4,0,2); s5=std(t5,0,2); s6=std(t6,0,2); s7=std(t7,0,2);
393 s8=std(t8,0,2); s9=std(t9,0,2); s10=std(t10,0,2); s11=std(t11,0,2);
394 s12=std(t12,0,2); s13=std(t13,0,2); s14=std(t14,0,2);
395 s15=std(t15,0,2); s16=std(t16,0,2); s17=std(t17,0,2);
396 s18=std(t18,0,2); s19=std(t19,0,2); s20=std(t20,0,2);
397 s21=std(t21,0,2); s22=std(t22,0,2); s23=std(t23,0,2);
398 s24=std(t24,0,2); s25=std(t25,0,2); s26=std(t26,0,2);
399 s27=std(t27,0,2); s28=std(t28,0,2); s29=std(t29,0,2);
400 s30=std(t30,0,2); s31=std(t31,0,2); s32=std(t32,0,2);
401 s33=std(t33,0,2); s34=std(t34,0,2); s35=std(t35,0,2);
402 s36=std(t36,0,2); s37=std(t37,0,2); s38=std(t38,0,2);
403 s39=std(t39,0,2); s40=std(t40,0,2); s41=std(t41,0,2);
404 s42=std(t42,0,2); s43=std(t43,0,2); s44=std(t44,0,2);
405 s45=std(t45,0,2); s46=std(t46,0,2); s47=std(t47,0,2);
406 s48=std(t48,0,2); s49=std(t49,0,2); s50=std(t50,0,2);
407 s51=std(t51,0,2); s52=std(t52,0,2); s53=std(t53,0,2);
408 s54=std(t54,0,2); s55=std(t55,0,2); s56=std(t56,0,2);
409 s57=std(t57,0,2); s58=std(t58,0,2); s59=std(t59,0,2);
410 s60=std(t60,0,2); s61=std(t61,0,2); s62=std(t62,0,2);
411 s63=std(t63,0,2); s64=std(t64,0,2); s65=std(t65,0,2);
412 s66=std(t66,0,2); s67=std(t67,0,2); s68=std(t68,0,2);
413 s69=std(t69,0,2); s70=std(t70,0,2);
414
415 % Cálculo das matrizes transpostas da média para representação da

```

```

416 % evolução da transmitância para certos comprimentos de onda nas
417 % diferentes escalas de tempo
418 m0=m0'; m1=m1'; m2=m2'; m3=m3'; m4=m4'; m5=m5'; m6=m6'; m7=m7';
419 m8=m8'; m9=m9'; m10=m10'; m11=m11'; m12=m12'; m13=m13'; m14=m14';
420 m15=m15'; m16=m16'; m17=m17'; m18=m18'; m19=m19'; m20=m20';
421 m21=m21'; m22=m22'; m23=m23'; m24=m24'; m25=m25'; m26=m26';
422 m27=m27'; m28=m28'; m29=m29'; m30=m30'; m31=m31'; m32=m32';
423 m33=m33'; m34=m34'; m35=m35'; m36=m36'; m37=m37'; m38=m38';
424 m39=m39'; m40=m40'; m41=m41'; m42=m42'; m43=m43'; m44=m44';
425 m45=m45'; m46=m46'; m47=m47'; m48=m48'; m49=m49'; m50=m50';
426 m51=m51'; m52=m52'; m53=m53'; m54=m54'; m55=m55'; m56=m56';
427 m57=m57'; m58=m58'; m59=m59'; m60=m60'; m61=m61'; m62=m62';
428 m63=m63'; m64=m64'; m65=m65'; m66=m66'; m67=m67'; m68=m68';
429 m69=m69'; m70=m70';
430
431 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
432 % em todos os espectros para representação da evolução temporal da
433 % transmitância média na escala de tempo longa
434 lamb1_x=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15];
435 lamb1_y=[m0(82,1),m12(82,1),m24(82,1),m30(82,1),m36(82,1), ↵
           m42(82,1),m48(82,1),m54(82,1),m56(82,1),m58(82,1), ↵
           m60(82,1),m62(82,1),m64(82,1),m66(82,1),m68(82,1), ↵
           m70(82,1)];
436 lamb2_y=[m0(144,1),m12(144,1),m24(144,1),m30(144,1),m36(144,1), ↵
           m42(144,1),m48(144,1),m54(144,1),m56(144,1),m58(144,1), ↵
           m60(144,1),m62(144,1),m64(144,1),m66(144,1),m68(144,1), ↵
           m70(144,1)];
437 lamb3_y=[m0(216,1),m12(216,1),m24(216,1),m30(216,1),m36(216,1), ↵
           m42(216,1),m48(216,1),m54(216,1),m56(216,1),m58(216,1), ↵
           m60(216,1),m62(216,1),m64(216,1),m66(216,1),m68(216,1), ↵
           m70(216,1)];
438 lamb4_y=[m0(290,1),m12(290,1),m24(290,1),m30(290,1),m36(290,1), ↵
           m42(290,1),m48(290,1),m54(290,1),m56(290,1),m58(290,1), ↵
           m60(290,1),m62(290,1),m64(290,1),m66(290,1),m68(290,1), ↵
           m70(290,1)];
439 lamb5_y=[m0(332,1),m12(332,1),m24(332,1),m30(332,1),m36(332,1), ↵
           m42(332,1),m48(332,1),m54(332,1),m56(332,1),m58(332,1), ↵
           m60(332,1),m62(332,1),m64(332,1),m66(332,1),m68(332,1), ↵
           m70(332,1)];
440 lamb6_y=[m0(380,1),m12(380,1),m24(380,1),m30(380,1),m36(380,1), ↵
           m42(380,1),m48(380,1),m54(380,1),m56(380,1),m58(380,1), ↵
           m60(380,1),m62(380,1),m64(380,1),m66(380,1),m68(380,1), ↵
           m70(380,1)];
441 lamb7_y=[m0(474,1),m12(474,1),m24(474,1),m30(474,1),m36(474,1), ↵
           m42(474,1),m48(474,1),m54(474,1),m56(474,1),m58(474,1), ↵
           m60(474,1),m62(474,1),m64(474,1),m66(474,1),m68(474,1), ↵
           m70(474,1)];
442 lamb8_y=[m0(563,1),m12(563,1),m24(563,1),m30(563,1),m36(563,1), ↵
           m42(563,1),m48(563,1),m54(563,1),m56(563,1),m58(563,1), ↵
           m60(563,1),m62(563,1),m64(563,1),m66(563,1),m68(563,1), ↵
           m70(563,1)];
443 lamb9_y=[m0(759,1),m12(759,1),m24(759,1),m30(759,1),m36(759,1), ↵
           m42(759,1),m48(759,1),m54(759,1),m56(759,1),m58(759,1), ↵
           m60(759,1),m62(759,1),m64(759,1),m66(759,1),m68(759,1), ↵
           m70(759,1)];
444 lamb10_y=[m0(1001,1),m12(1001,1),m24(1001,1),m30(1001,1), ↵
            m36(1001,1),m42(1001,1),m48(1001,1),m54(1001,1), ↵

```

```

m56(1001,1),m58(1001,1),m60(1001,1),m62(1001,1),
m64(1001,1),m66(1001,1),m68(1001,1),m70(1001,1)];
445
446 % Representação da evolução temporal da transmitância média,
447 % normalizada ao espectro medido em t=0 (tecido natural), do
448 % musculo imerso em Glicerina 50% para certos comprimentos de
449 % onda em escala de tempo longa
450 % Figura 4
451 figure
452 plot(lamb1_x,lamb1_y,lamb1_x,lamb2_y,lamb1_x,lamb3_y,
      lamb1_x,lamb4_y,lamb1_x,lamb5_y, lamb1_x,lamb6_y,
      lamb1_x,lamb7_y,lamb1_x,lamb8_y,lamb1_x,lamb9_y,
      lamb1_x,lamb10_y);
453 axis([0 15 1 2.1]);
454 xlabel('Tempo (minutos)');
455 ylabel('Transmitância (U.A.)')
456 title('Evolução temporal da transmitância média (normalizada a
      t=0)para certos comprimentos de onda');
457 legend('390nm' , '420nm' , '455nm' , '490nm' , '510nm' , '532nm' ,
      '575nm' , '615nm' , '700nm' , '800nm');
458
459 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
460 % em todos os espectros nos 2 primeiros minutos de acção do agente
461 lambda1_x=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,
      90,95,100,105,110,115,120];
462 lambda1_y=[m0(82,1),m1(82,1),m2(82,1),m3(82,1),m4(82,1),m5(82,1),
      m6(82,1),m7(82,1),m8(82,1),m9(82,1),m10(82,1),
      m11(82,1),m12(82,1),m13(82,1),m14(82,1),m15(82,1),
      m16(82,1),m17(82,1),m18(82,1),m19(82,1),m20(82,1),
      m21(82,1),m22(82,1),m23(82,1),m24(82,1)];
463 lambda2_y=[m0(144,1),m1(144,1),m2(144,1),m3(144,1),m4(144,1),
      m5(144,1),m6(144,1),m7(144,1),m8(144,1),m9(144,1),
      m10(144,1),m11(144,1),m12(144,1),m13(144,1),
      m14(144,1),m15(144,1),m16(144,1),m17(144,1),
      m18(144,1),m19(144,1),m20(144,1),m21(144,1),
      m22(144,1),m23(144,1),m24(144,1)];
464 lambda3_y=[m0(216,1),m1(216,1),m2(216,1),m3(216,1),m4(216,1),
      m5(216,1),m6(216,1),m7(216,1),m8(216,1),m9(216,1),
      m10(216,1),m11(216,1),m12(216,1),m13(216,1),
      m14(216,1),m15(216,1),m16(216,1),m17(216,1),
      m18(216,1),m19(216,1),m20(216,1),m21(216,1),
      m22(216,1),m23(216,1),m24(216,1)];
465 lambda4_y=[m0(290,1),m1(290,1),m2(290,1),m3(290,1),m4(290,1),
      m5(290,1),m6(290,1),m7(290,1),m8(290,1),m9(290,1),
      m10(290,1),m11(290,1),m12(290,1),m13(290,1),
      m14(290,1),m15(290,1),m16(290,1),m17(290,1),
      m18(290,1),m19(290,1),m20(290,1),m21(290,1),
      m22(290,1),m23(290,1),m24(290,1)];
466 lambda5_y=[m0(332,1),m1(332,1),m2(332,1),m3(332,1),m4(332,1),
      m5(332,1),m6(332,1),m7(332,1),m8(332,1),m9(332,1),
      m10(332,1),m11(332,1),m12(332,1),m13(332,1),
      m14(332,1),m15(332,1),m16(332,1),m17(332,1),
      m18(332,1),m19(332,1),m20(332,1),m21(332,1),
      m22(332,1),m23(332,1),m24(332,1)];
467 lambda6_y=[m0(380,1),m1(380,1),m2(380,1),m3(380,1),m4(380,1),
      m5(380,1),m6(380,1),m7(380,1),m8(380,1),m9(380,1),

```

```

        m10(380,1),m11(380,1),m12(380,1),m13(380,1), ↵
        m14(380,1),m15(380,1),m16(380,1),m17(380,1), ↵
        m18(380,1),m19(380,1),m20(380,1),m21(380,1), ↵
        m22(380,1),m23(380,1),m24(380,1)];
468 lambda7_y=[m0(474,1),m1(474,1),m2(474,1),m3(474,1),m4(474,1), ↵
        m5(474,1),m6(474,1),m7(474,1),m8(474,1),m9(474,1), ↵
        m10(474,1),m11(474,1),m12(474,1),m13(474,1), ↵
        m14(474,1),m15(474,1),m16(474,1),m17(474,1), ↵
        m18(474,1),m19(474,1),m20(474,1),m21(474,1), ↵
        m22(474,1),m23(474,1),m24(474,1)];
469 lambda8_y=[m0(563,1),m1(563,1),m2(563,1),m3(563,1),m4(563,1), ↵
        m5(563,1),m6(563,1),m7(563,1),m8(563,1),m9(563,1), ↵
        m10(563,1),m11(563,1),m12(563,1),m13(563,1), ↵
        m14(563,1),m15(563,1),m16(563,1),m17(563,1), ↵
        m18(563,1),m19(563,1),m20(563,1),m21(563,1), ↵
        m22(563,1),m23(563,1),m24(563,1)];
470 lambda9_y=[m0(759,1),m1(759,1),m2(759,1),m3(759,1),m4(759,1), ↵
        m5(759,1),m6(759,1),m7(759,1),m8(759,1),m9(759,1), ↵
        m10(759,1),m11(759,1),m12(759,1),m13(759,1), ↵
        m14(759,1),m15(759,1),m16(759,1),m17(759,1), ↵
        m18(759,1),m19(759,1),m20(759,1),m21(759,1), ↵
        m22(759,1),m23(759,1),m24(759,1)];
471 lambda10_y=[m0(1001,1),m1(1001,1),m2(1001,1),m3(1001,1), ↵
        m4(1001,1),m5(1001,1),m6(1001,1),m7(1001,1), ↵
        m8(1001,1),m9(1001,1),m10(1001,1),m11(1001,1), ↵
        m12(1001,1),m13(1001,1),m14(1001,1),m15(1001,1), ↵
        m16(1001,1),m17(1001,1),m18(1001,1),m19(1001,1), ↵
        m20(1001,1),m21(1001,1),m22(1001,1),m23(1001,1), ↵
        m24(1001,1)];
472
473 % Representação da evolução temporal da transmitância média,
474 % normalizada ao espectro medido em t=0 (tecido natural), do
475 % musculo imerso em Glicerina 50% para certos comprimentos de
476 % onda nos 2 primeiros minutos
477 % Figura 5
478 figure
479 plot(lambda1_x,lambda1_y,lambda1_x,lambda2_y,lambda1_x,lambda3_y,↵
        lambda1_x,lambda4_y,lambda1_x,lambda5_y,lambda1_x,lambda6_y,↵
        lambda1_x,lambda7_y,lambda1_x,lambda8_y,lambda1_x,lambda9_y,↵
        lambda1_x,lambda10_y);
480 axis([0 120 1 1.95]);
481 xlabel('Tempo (segundos)');
482 ylabel('Transmitância (U.A.)')
483 title('Evolução temporal da transmitância média (normalizada a ↵
        t=0) para certos comprimentos de onda nos primeiros 2 ↵
        minutos');
484 legend('390nm','420nm','455nm','490nm','510nm','532nm','575nm', ↵
        '615nm','700nm','800nm');
485
486 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
487 % em todos os espectros de desvio padrão para representação na
488 % escala de tempo longa
489 lsx=[0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15];
490 ls1=[s0(82,1),s12(82,1),s24(82,1),s30(82,1),s36(82,1),s42(82,1), ↵
        s48(82,1),s54(82,1),s56(82,1),s58(82,1),s60(82,1),s62(82,1),↵
        s64(82,1),s66(82,1),s68(82,1),s70(82,1)];

```



```

491 ls2=[s0(144,1),s12(144,1),s24(144,1),s30(144,1),s36(144,1), ↵
      s42(144,1),s48(144,1),s54(144,1),s56(144,1),s58(144,1), ↵
      s60(144,1),s62(144,1),s64(144,1),s66(144,1),s68(144,1), ↵
      s70(144,1)];
492 ls3=[s0(216,1),s12(216,1),s24(216,1),s30(216,1),s36(216,1), ↵
      s42(216,1),s48(216,1),s54(216,1),s56(216,1),s58(216,1), ↵
      s60(216,1),s62(216,1),s64(216,1),s66(216,1),s68(216,1), ↵
      s70(216,1)];
493 ls4=[s0(290,1),s12(290,1),s24(290,1),s30(290,1),s36(290,1), ↵
      s42(290,1),s48(290,1),s54(290,1),s56(290,1),s58(290,1), ↵
      s60(290,1),s62(290,1),s64(290,1),s66(290,1),s68(290,1), ↵
      s70(290,1)];
494 ls5=[s0(332,1),s12(332,1),s24(332,1),s30(332,1),s36(332,1), ↵
      s42(332,1),s48(332,1),s54(332,1),s56(332,1),s58(332,1), ↵
      s60(332,1),s62(332,1),s64(332,1),s66(332,1),s68(332,1), ↵
      s70(332,1)];
495 ls6=[s0(380,1),s12(380,1),s24(380,1),s30(380,1),s36(380,1), ↵
      s42(380,1),s48(380,1),s54(380,1),s56(380,1),s58(380,1), ↵
      s60(380,1),s62(380,1),s64(380,1),s66(380,1),s68(380,1), ↵
      s70(380,1)];
496 ls7=[s0(474,1),s12(474,1),s24(474,1),s30(474,1),s36(474,1), ↵
      s42(474,1),s48(474,1),s54(474,1),s56(474,1),s58(474,1), ↵
      s60(474,1),s62(474,1),s64(474,1),s66(474,1),s68(474,1), ↵
      s70(474,1)];
497 ls8=[s0(563,1),s12(563,1),s24(563,1),s30(563,1),s36(563,1), ↵
      s42(563,1),s48(563,1),s54(563,1),s56(563,1),s58(563,1), ↵
      s60(563,1),s62(563,1),s64(563,1),s66(563,1),s68(563,1), ↵
      s70(563,1)];
498 ls9=[s0(759,1),s12(759,1),s24(759,1),s30(759,1),s36(759,1), ↵
      s42(759,1),s48(759,1),s54(759,1),s56(759,1),s58(759,1), ↵
      s60(759,1),s62(759,1),s64(759,1),s66(759,1),s68(759,1), ↵
      s70(759,1)];
499 ls10=[s0(1001,1),s12(1001,1),s24(1001,1),s30(1001,1), ↵
      s36(1001,1),s42(1001,1),s48(1001,1),s54(1001,1), ↵
      s56(1001,1),s58(1001,1),s60(1001,1),s62(1001,1), ↵
      s64(1001,1),s66(1001,1),s68(1001,1),s70(1001,1)];
500
501 % Normalização do Desvio padrão à Média
502 ls1=100.*ls1./lamb1_y; ls2=100.*ls2./lamb2_y;
503 ls3=100.*ls3./lamb3_y; ls4=100.*ls4./lamb4_y;
504 ls5=100.*ls5./lamb5_y; ls6=100.*ls6./lamb6_y;
505 ls7=100.*ls7./lamb7_y; ls8=100.*ls8./lamb8_y;
506 ls9=100.*ls9./lamb9_y; ls10=100.*ls10./lamb10_y;
507
508 % Representação da evolução temporal do desvio padrão do musculo
509 % imerso em Glicerina 50% para certos comprimentos de onda em
510 % escala de tempo longa
511 % Figura 6
512 figure
513 plot(lsx,ls1,lsx,ls2,lsx,ls3,lsx,ls4,lsx,ls5,lsx,ls6,lsx,ls7, ↵
      lsx,ls8,lsx,ls9,lsx,ls10);
514 axis([0 15 0 0.34]);
515 xlabel('Tempo (minutos)');
516 ylabel('Desvio padrão (U.A.)')
517 title('Evolução temporal do Desvio Padrão para certos ↵
      comprimentos de onda');
518 legend('390nm' , '420nm' , '455nm' , '490nm' , '510nm' , '532nm' , ↵

```

```

        '575nm','615nm','700nm','800nm');
519
520 % Escolha dos valores espectrais para o mesmo comprimento de onda
521 % em todos os espectros de desvio padrão para representação na
522 % escala de tempo curta
523 ssx=[0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,  ↵
        100,105,110,115,120];
524 ss1=[s0(82,1),s1(82,1),s2(82,1),s3(82,1),s4(82,1),s5(82,1),  ↵
        s6(82,1),s7(82,1),s8(82,1),s9(82,1),s10(82,1),s11(82,1),  ↵
        s12(82,1),s13(82,1),s14(82,1),s15(82,1),s16(82,1),s17(82,1),↵
        s18(82,1),s19(82,1),s20(82,1),s21(82,1),s22(82,1),s23(82,1),↵
        s24(82,1)];
525 ss2=[s0(144,1),s1(144,1),s2(144,1),s3(144,1),s4(144,1),s5(144,1),↵
        s6(144,1),s7(144,1),s8(144,1),s9(144,1),s10(144,1),  ↵
        s11(144,1),s12(144,1),s13(144,1),s14(144,1),s15(144,1),  ↵
        s16(144,1),s17(144,1),s18(144,1),s19(144,1),s20(144,1),  ↵
        s21(144,1),s22(144,1),s23(144,1),s24(144,1)];
526 ss3=[s0(216,1),s1(216,1),s2(216,1),s3(216,1),s4(216,1),s5(216,1),↵
        s6(216,1),s7(216,1),s8(216,1),s9(216,1),s10(216,1),  ↵
        s11(216,1),s12(216,1),s13(216,1),s14(216,1),s15(216,1),  ↵
        s16(216,1),s17(216,1),s18(216,1),s19(216,1),s20(216,1),  ↵
        s21(216,1),s22(216,1),s23(216,1),s24(216,1)];
527 ss4=[s0(290,1),s1(290,1),s2(290,1),s3(290,1),s4(290,1),s5(290,1),↵
        s6(290,1),s7(290,1),s8(290,1),s9(290,1),s10(290,1),  ↵
        s11(290,1),s12(290,1),s13(290,1),s14(290,1),s15(290,1),  ↵
        s16(290,1),s17(290,1),s18(290,1),s19(290,1),s20(290,1),  ↵
        s21(290,1),s22(290,1),s23(290,1),s24(290,1)];
528 ss5=[s0(332,1),s1(332,1),s2(332,1),s3(332,1),s4(332,1),s5(332,1),↵
        s6(332,1),s7(332,1),s8(332,1),s9(332,1),s10(332,1),  ↵
        s11(332,1),s12(332,1),s13(332,1),s14(332,1),s15(332,1),  ↵
        s16(332,1),s17(332,1),s18(332,1),s19(332,1),s20(332,1),  ↵
        s21(332,1),s22(332,1),s23(332,1),s24(332,1)];
529 ss6=[s0(380,1),s1(380,1),s2(380,1),s3(380,1),s4(380,1),s5(380,1),↵
        s6(380,1),s7(380,1),s8(380,1),s9(380,1),s10(380,1),  ↵
        s11(380,1),s12(380,1),s13(380,1),s14(380,1),s15(380,1),  ↵
        s16(380,1),s17(380,1),s18(380,1),s19(380,1),s20(380,1),  ↵
        s21(380,1),s22(380,1),s23(380,1),s24(380,1)];
530 ss7=[s0(474,1),s1(474,1),s2(474,1),s3(474,1),s4(474,1),s5(474,1),↵
        s6(474,1),s7(474,1),s8(474,1),s9(474,1),s10(474,1),  ↵
        s11(474,1),s12(474,1),s13(474,1),s14(474,1),s15(474,1),  ↵
        s16(474,1),s17(474,1),s18(474,1),s19(474,1),s20(474,1),  ↵
        s21(474,1),s22(474,1),s23(474,1),s24(474,1)];
531 ss8=[s0(563,1),s1(563,1),s2(563,1),s3(563,1),s4(563,1),s5(563,1),↵
        s6(563,1),s7(563,1),s8(563,1),s9(563,1),s10(563,1),  ↵
        s11(563,1),s12(563,1),s13(563,1),s14(563,1),s15(563,1),  ↵
        s16(563,1),s17(563,1),s18(563,1),s19(563,1),s20(563,1),  ↵
        s21(563,1),s22(563,1),s23(563,1),s24(563,1)];
532 ss9=[s0(759,1),s1(759,1),s2(759,1),s3(759,1),s4(759,1),s5(759,1),↵
        s6(759,1),s7(759,1),s8(759,1),s9(759,1),s10(759,1),  ↵
        s11(759,1),s12(759,1),s13(759,1),s14(759,1),s15(759,1),  ↵
        s16(759,1),s17(759,1),s18(759,1),s19(759,1),s20(759,1),  ↵
        s21(759,1),s22(759,1),s23(759,1),s24(759,1)];
533 ss10=[s0(1001,1),s1(1001,1),s2(1001,1),s3(1001,1),s4(1001,1),  ↵
        s5(1001,1),s6(1001,1),s7(1001,1),s8(1001,1),s9(1001,1),  ↵
        s10(1001,1),s11(1001,1),s12(1001,1),s13(1001,1),  ↵

```

```

s14(1001,1),s15(1001,1),s16(1001,1),s17(1001,1), ↵
s18(1001,1),s19(1001,1),s20(1001,1),s21(1001,1), ↵
s22(1001,1),s23(1001,1),s24(1001,1)];
534
535 % Normalização dos desvio padrão em relação à Média
536 ss1=100.*ss1./lambda1_y; ss2=100.*ss2./lambda2_y;
537 ss3=100.*ss3./lambda3_y; ss4=100.*ss4./lambda4_y;
538 ss5=100.*ss5./lambda5_y; ss6=100.*ss6./lambda6_y;
539 ss7=100.*ss7./lambda7_y; ss8=100.*ss8./lambda8_y;
540 ss9=100.*ss9./lambda9_y; ss10=100.*ss10./lambda10_y;
541
542 % Representação da evolução temporal do desvio padrão das medições
543 % feitas em transmissão no musculo imerso em Glicerina 50% para
544 % certos comprimentos de onda nos 2 primeiros minutos
545 %% Figura 7
546 figure
547 plot(ssx,ss1,ssx,ss2,ssx,ss3,ssx,ss4,ssx,ss5,ssx,ss6,ssx,ss7, ↵
      ssx,ss8,ssx,ss9,ssx,ss10);
548 axis([0 120 0 0.3]);
549 xlabel('Tempo (s)');
550 ylabel('Desvio padrão (U.A.)')
551 title('Evolução do Desvio Padrão para certos comprimentos de onda ↵
      nos 2 primeiros minutos');
552 legend('390nm' , '420nm' , '455nm' , '490nm' , '510nm' , '532nm' , ↵
      '575nm' , '615nm' , '700nm' , '800nm');
553
554 % Construção da matriz para representação 3D dos espectros de
555 % transmitância do tecido sob efeito ↵
      da Glicerina
556
557 % Componente do tempo da matriz
558 zero=x*0;
559 M_t=[zero,zero+5,zero+10,zero+15,zero+20,zero+25,zero+30,zero+35,↵
      zero+40,zero+45,zero+50,zero+55,zero+60,zero+65,zero+70, ↵
      zero+75,zero+80,zero+85,zero+90,zero+95,zero+100,zero+105, ↵
      zero+110,zero+115,zero+120];
560 % Componente de comprimento de onda da matriz
561 M_c=[x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x,x];
562 % Componente de transmissão média da matriz
563 M_tr=[m0,m1,m2,m3,m4,m5,m6,m7,m8,m9,m10,m11,m12,m13,m14,m15,m16, ↵
      m17,m18,m19,m20,m21,m22,m23,m24];
564
565 % Figura 8
566 figure
567 plot3(M_c(50:2000,:),M_t(50:2000,:),M_tr(50:2000,:))
568 axis([365,1100,0,120,0.9,2.2]);
569 xlabel('Comprimento de onda (nm)');
570 ylabel('tempo (s)');
571 zlabel('Transmitância (U.A.)');
572 title('Evolução temporal do espectro médio de transmitância do ↵
      músculo imerso em Glicerina 50%');

```